

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI ASAM
LAKTAT ASAL KOLON KELINCI (*Oryctolagus
Cuniculus*) SEBAGAI KANDIDAT PROBIOTIK**

SKRIPSI

Oleh :

**RIZKY PUTRI KARINA
115130107111019**



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI ASAM LAKTAT ASAL KOLON KELINCI (*Oryctolagus Cuniculus*) SEBAGAI KANDIDAT PROBIOTIK

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

RIZKY PUTRI KARINA
115130107111019



PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Asal Kolon Kelinci (*Oryctolagus Cuniculus*) Sebagai Kandidat Probiotik

oleh:

RIZKY PUTRI KARINA
115130107111019

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
Pada tanggal 19 Desember 2017
Dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

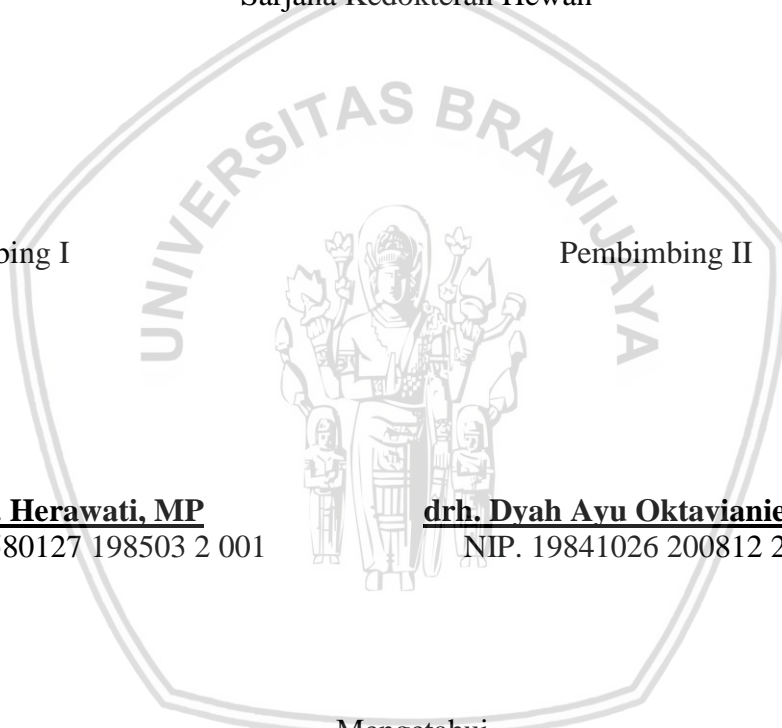
Pembimbing II

Dr. Dra. Herawati, MP
NIP. 19580127 198503 2 001

drh. Dyah Ayu Oktaviane, M.Biotech
NIP. 19841026 200812 2 004

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001



IDENTITAS TIM PENGUJI

Judul Skripsi : Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Asal Kolon Kelinci (*Oryctolagus Cuniculus*) Sebagai Kandidat Probiotik

Nama Mahasiswa : Rizky Putri Karina
NIM : 115130107111019

Program Studi : Kedokteran Hewan

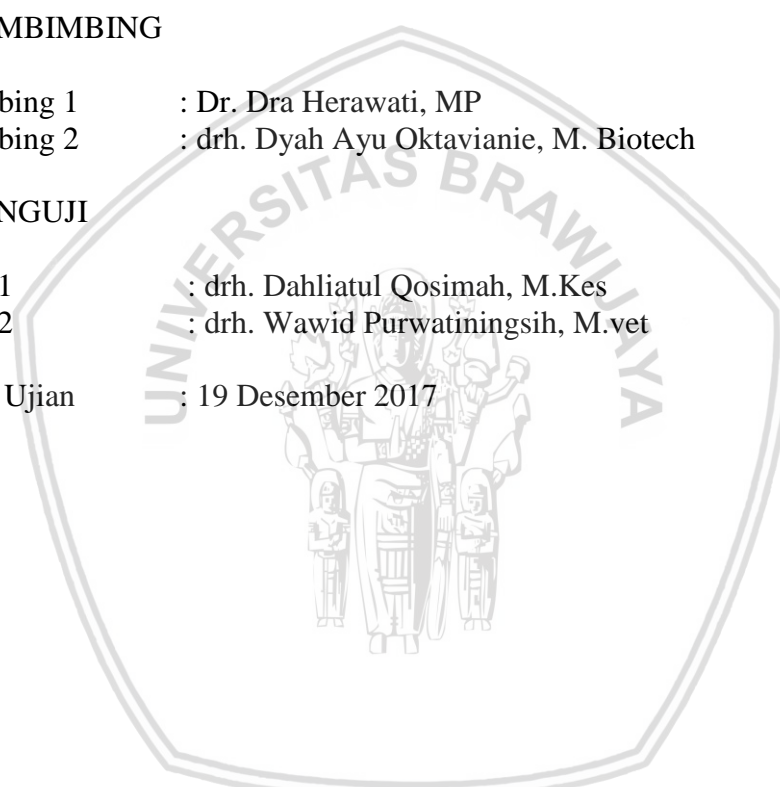
TIM PEMBIMBING

Pembimbing 1 : Dr. Dra Herawati, MP
Pembimbing 2 : drh. Dyah Ayu Oktaviane, M. Biotech

TIM PENGUJI

Penguji 1 : drh. Dahliatul Qosimah, M.Kes
Penguji 2 : drh. Wawid Purwatiningsih, M.vet

Tanggal Ujian : 19 Desember 2017



LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Rizky Putri Karina

NIM : 115130107111019

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi Berjudul:

Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Asal Kolon Kelinci
(*Oryctolagus Cuniculus*) Sebagai Kandidat Probiotik

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama - nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 12 Januari 2018
Yang menyatakan,

(Rizky Putri Karina)
Nim. 115130107111019

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

Nama : Rizky Putri Karina

NIM : 115130107111019

Tempat, Tanggal Lahir : Probolinggo, 14 Desember 1993

Agama : Islam

Alamat : Jl. Merapi II No. 23, Triwung Lor, Kota Probolinggo

Jenis Kelamin : Perempuan

Alamat Email : rizkyputrikarina@gmail.com

Riwayat Pendidikan : 1. SDN Triwung Lor 3 (1999 – 2005)

2. SMPN 9 Kota Probolinggo (2005 – 2008)

3. SMAN 4 Kota Probolinggo (2008 – 2011)

Riwayat Organisasi : 1. Anggota Ikatan Minat Profesi Ternak Besar

2. Staff magang anggota BEM 2012

3. Staff RKIM (riset karya ilmiah mahasiswa) 2012

KATA PENGANTAR

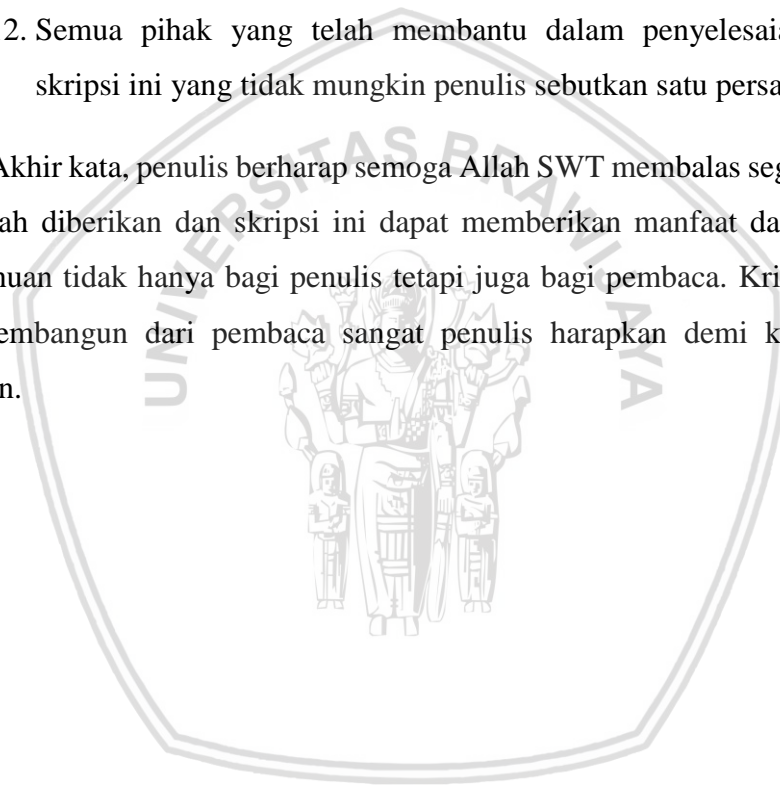
Puji syukur kehadiran Allah SWT Yang Maha Mendengar lagi Maha Melihat dan atas segala limpahan rahmat, taufik, serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir/skripsi yang berjudul “Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat sebagai Kandidat Probiotik” dengan baik.

Penyusunan skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya. Dalam Penulisan skripsi ini tidak lepas dari bantuan dan dukungan baik moril maupun materil dari semua pihak, oleh karena itu pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada :

1. Dr. Dra. Herawati, MP selaku dosen pembimbing I yang dengan sabar telah membimbing, memberikan dorongan, bimbingan dan masukan yang bermanfaat dalam penyusunan skripsi ini.
2. Drh. Dyah Ayu Oktavianie A.P, M. Biotech selaku dosen pembimbing II yang dengan sabar telah membimbing, memberikan dorongan, bimbingan dan masukan yang bermanfaat dalam penyusunan skripsi ini.
3. Drh. Dahliatul Qosimah, M. Kes selaku dosen penguji I yang memberikan saran dan kritik kepada penulis
4. Drh. Wawid Purwatiningsih, M.Vet selaku dosen penguji II yang memberikan saran dan kritik kepada penulis
5. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang.
6. Segenap dosen pengajar, terima kasih atas ilmu yang telah diberikan kepada penulis.
7. Keluarga Penulis, Dra. Joesti Winarni, Ir. Mukti Kanana, Syahbana Endra Prakoso dan Zakarisa Trisna Prawiro Negoro tercinta yang senantiasa memberikan dorongan, semangat, dan doa yang tiada henti.

8. Mohamad Fikri Arif, S.TP sebagai partner yang kerap mendampingi dalam proses pengerjaan tugas akhir serta atas doa, motivasi dan inspirasi kepada penulis.
9. Keluarga besar BEBELUCK FKH UB kelas B 2011, adik dan kakak angkatan yang selalu memberikan dorongan, semangat dan inspirasi.
10. Tim peneliti kandidat probiotik kelinci, Agdila, Lega, Fachrian, Yossi, Yoga yang selalu memberikan dorongan, semangat dan inspirasi.
11. Keluarga KS 115B yang selalu memberikan dorongan, semangat, inspirasi dan keceriaan.
12. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan skripsi ini yang tidak mungkin penulis sebutkan satu persatu.

Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan dan skripsi ini dapat memberikan manfaat dan menambah pengetahuan tidak hanya bagi penulis tetapi juga bagi pembaca. Kritik dan saran yang membangun dari pembaca sangat penulis harapkan demi kesempurnaan penulisan.



Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat asal Kolon Kelinci (*Oryctolagus Cuniculus*) Sebagai Kandidat Probiotik

ABSTRAK

Bakteri asam laktat adalah mikroflora normal yang dapat diisolasi dari kolon kelinci yang berpotensi sebagai probiotik. Probiotik adalah suplemen makanan berupa bakteri hidup yang non patogen, tidak toksik, tahan terhadap asam lambung dan dapat berkoloni pada usus besar (kolon). Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri asam laktat dari kolon kelinci dan mengetahui potensinya sebagai probiotik. Sampel yang digunakan adalah tiga kelinci jantan usia 35 hari. Isolasi menggunakan MRSA (*deMan Rogosa Sharpe Agar*) + CaCO_3 . Hasil penelitian menunjukkan bakteri yang diisolasi dari kerokan kolon kelinci didapatkan hasil $2,96 \pm 0,51 \times 10^5$ cfu/ml sedangkan pada bilasan kolon kelinci didapatkan hasil $1,60 \pm 0,14 \times 10^5$ cfu/ml. Berdasarkan uji karakterisasi morfologi didapatkan hasil 30 isolat kemudian di *screening* dengan uji katalase dan uji pewarnaan gram sehingga diperoleh 14 isolat terpilih dengan ciri berbentuk basil dan kokus serta bersifat katalase negatif dan gram positif. Pada 14 isolat dilakukan uji fisiologi, uji biokimia kemudian dianalisis nilai similaritas menggunakan software CLAD 97, hasil menunjukkan isolat merupakan genus *Lactobacillus sp.* dan *Lactococcus sp.* Hasil uji potensi probiotik menunjukkan bakteri tersebut berpotensi sebagai probiotik karena mampu bertahan pada pH 2 dan tahan garam empedu. Analisa hasil menggunakan analisis deskriptif kualitatif pada uji karakterisasi fenotip dan dipilih isolat terbaik yang berpotensi sebagai kandidat probiotik dengan metode ranking. Isolat AV memiliki nilai ketahanan asam tertinggi yaitu 92,00%. Kemampuan adaptasi terhadap garam empedu 0,3% menunjukkan isolat AV memiliki ketahanan paling tinggi sebesar 94,17%. Disimpulkan bahwa bakteri asam laktat isolat AV merupakan bakteri *Lactobacillus plantarum* yang telah di isolasi dan dikarakterisasi serta di uji potensi adalah isolat yang memiliki potensi sebagai kandidat probiotik.

Kata Kunci: Probiotik, kelinci, Bakteri Asam Laktat

Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria from Rabbit (*Oryctolagus Cuniculus*) as Probiotic Candidate

ABSTRACT

Lactic acid bacteria are normal microflora that can be isolated from rabbit colon potentially as probiotics. Probiotics are dietary supplements in the form of live bacteria that are non-pathogenic, non toxic, resistant to stomach acid and colonize colon (colon). This study was aimed to isolate and characterize lactic acid bacteria from rabbit colon and investigate the potency as probiotics. The samples used were three male rabbits aged 35 days. Isolation using MRSA (deMan Rogosa Sharpe Agar) + CaCO_3 . The results showed that the isolated bacteria from rabbit colon collected were $2,96 \pm 0,51 \times 10^5$ cfu / ml while rabbit colon was found $1.60 \pm 0.14 \times 10^5$ cfu / ml. Based on morphological characterization test, the result of 30 isolates was then screened by catalase test and gram staining test to obtain 14 selected isolates with basil and coccus characteristic and catalase negative and gram positive. In 14 isolates physiological test, biochemical test and then analyzed the similarity value using software CLAD 97, the results showed that isolates are genus *Lactobacillus sp.* and *Lactococcus sp.* Probiotic potential test results indicate the bacteria potentially as probiotics because it can survive in pH 2 and resist bile salts. Analysis of the results using qualitative descriptive analysis on the phenotypic characterization test and selected the best isolates potentially as probiotic candidates by ranking method. The AV isolate has the highest acid resistance value of 92.00%. Adaptive ability of 0.3% bile salt showed that AV isolate had the highest resistance of 94.17%. It was concluded that lactic acid bacteria of AV isolates were *Lactobacillus plantarum* bacteria that had been isolated and characterized as well as potential test were isolates that had potential as probiotic candidate.

Keywords: Probiotics, rabbits, Lactic Acid Bacteria

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan Penelitian	5
1.4 Manfaat	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Mikroflora Saluran Pencernaan Kelinci (New Zealand White)	6
2.2 Bakteri Asam Laktat Sebagai Probiotik	9
2.3 Karakteristik Probiotik	11
2.3.1 Ketahanan Terhadap Asam Lambung	11
2.3.2 Ketahanan Terhadap Garam Empedu	12
BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	14
3.1 Kerangka Konsep	14
3.2 Hipotesis Penelitian	16
BAB 4. METODOLOGI PENELITIAN	17
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	17
4.2 Bahan dan Alat Penelitian	17
4.2.1 Bahan Penelitian	17
4.2.2 Alat Penelitian	18
4.3 Tahapan Penelitian	18
4.4 Prosedur Kerja	18
4.4.1 Rancangan Penelitian	18
4.4.2 Pengambilan Sampel Kolon Kelinci	19
4.4.3 Isolasi dan Perhitungan BAL Asal Kolon Kelinci	20
4.4.4 Seleksi dan Permurnian BAL Asal Kolon Kelinci	21
4.4.5 Karakterisasi BAL Asal Kolon Kelinci	21
4.4.5.1 Pengujian Pertumbuhan Pada Suhu	22
4.4.5.2 Pengujian Sifat Biokimia BAL	23
4.4.5.3 Identifikasi Isolat	26

4.4.6. Uji Potensi BAL sebagai Probiotik	26
4.4.6.1 Uji Ketahanan Asam dan Pengaruh Perubahan pH	26
4.4.6.2 Uji Ketahanan Empedu.....	27
4.5 Analisis Data	28
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	29
5.1 Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat	29
5.2 Pengaruh Ketahanan Asam Lambung.....	35
5.3 Pengaruh Garam Empedu Terhadap Ketahanan Hidup BAL	37
5.4 Pemilihan Isolat BAL Terbaik Sebagai Probiotik	39
BAB 6. PENUTUP	41
6.1 Kesimpulan	41
6.2 Saran	41
DAFTAR PUSTAKA	42
LAMPIRAN	46



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
5.1 Rata-rata jumlah koloni bakteri asam laktat pada kolon kelinci	29
5.2 Morfologi bakteri asam laktat asal kolon kelinci	30
5.3 Karakterisasi isolat BAL asal kolon	32
5.4 Data uji ketahanan asam bakteri asam laktat asal kolon kelinci	37
5.5 Data uji pengaruh garam empedu pada ketahanan hidup BAL	38
5.6 Rangking isolat BAL asal kolon kelinci berdasarkan kemampuan ketahanan terhadap asam dan ketahanan terhadap garam empedu	40



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
3.1 Skema Kerja Konsep.....	14
5.1 Dendogram uji similaritas hubungan kekerabatan 14 isolat bakteri asam laktat asal kolon kelinci (<i>Oryctolagus cuniculus</i>).....	34



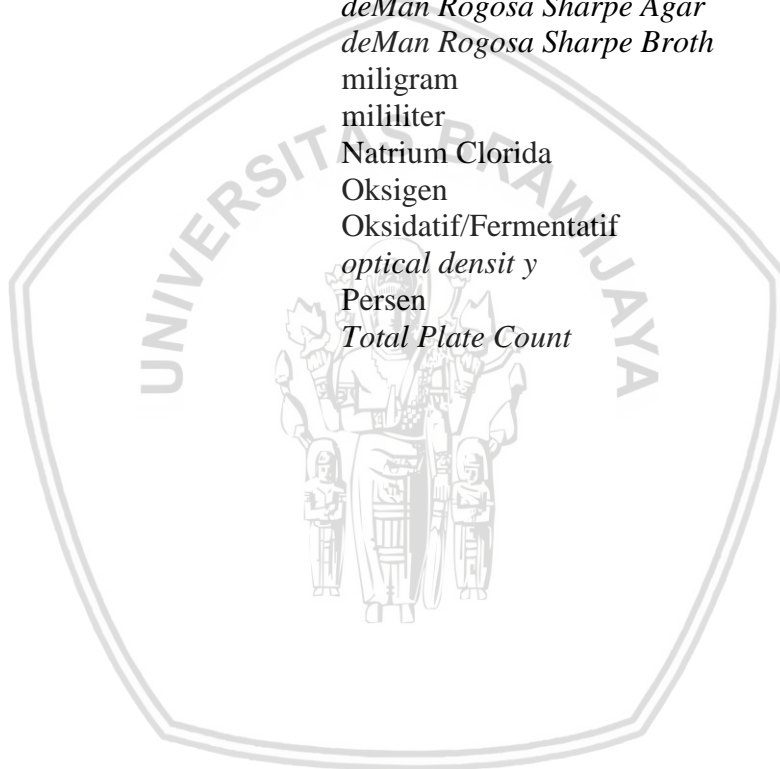
DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Kerja Penelitian	44
2. Langkah Kerja Uji Karakterisasi.....	45
3. Data Uji Pengaruh Garam Empedu Pada Ketahanan Hidup BAL.....	55
4. Dokumentasi penelitian.....	56



DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

Simbol/singkatan	Keterangan
BAL	Bakteri Asam Laktat
BPW	<i>Buffer Pepton Water</i>
$^{\circ}\text{C}$	<i>Celsius</i>
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>
CO_2	Karbon monoksida
g	gram
Hcl	Asam Klorida
H_2O	Hidrogen Oksida
kg	kilogram
MRSA	<i>deMan Rogosa Sharpe Agar</i>
MRSB	<i>deMan Rogosa Sharpe Broth</i>
mg	miligram
mL	mililiter
NaCl	Natrium Clorida
O_2	Oksigen
OF	Oksidatif/Fermentatif
OD	<i>optical densit y</i>
%	Persen
TPC	<i>Total Plate Count</i>



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Kebutuhan konsumsi daging masyarakat Indonesia pada tahun 2000 berkisar 1,6 juta ton, hal ini dikarenakan meningkatnya jumlah penduduk, sehingga kebutuhan daging di Indonesia tiap tahun mengalami peningkatan. Untuk meningkatkan produktifitas ternak perlu dilakukan usaha, salah satu cara meningkatkan produktivitas yaitu dengan memperbaiki pakan ternak menggunakan mikroorganisme seperti probiotik (Gunawan dan Sundari, 2003). Di Indonesia ternak kelinci mempunyai kemampuan kompetitif untuk bersaing dengan sumber daging lain dalam memenuhi kebutuhan hidup manusia (kebutuhan gizi) dan merupakan alternatif penyedia daging yang perlu dipertimbangkan dimasa akan datang. Daging kelinci merupakan salah satu daging yang berkualitas baik dan layak dikonsumsi (Dwiyanto, 2005). Daging kelinci mengandung 20-21% dari protein, asam lemak tak jenuh (oleat dan linoleat; 60% dari semua asam lemak), kalium, fosfor, dan magnesium, memiliki konsentrasi lemak yang rendah, kolesterol, dan natrium (Yanis, 2006). Seperti hewan lainnya, kelinci rentan terhadap serangan penyakit pencernaan maka perlu perawatan khusus. Jika terlambat dalam penanganannya menyebabkan kelinci lainnya akan tertular oleh kelinci yang sakit dan oleh sebab itu perlu dilakukan pencegahan yang diharapkan nantinya dapat mengurangi angka kematian kelinci (Hustamdin, 2006).

Probiotik adalah mikroorganisme hidup yang bila dikonsumsi dapat meningkatkan kesehatan manusia ataupun ternak dengan cara menyeimbangkan mikroflora dalam saluran pencernaan jika dikonsumsi dalam jumlah yang cukup

(Kusumawati *et al.*, 2003). Secara umum bakteri probiotik hidup didalam saluran pencernaan dan bermutualisme dengan tubuh inangnya, hidup pada pH 2-4, tidak mengakibatkan hal yang negatif pada tubuh, tidak patogen, umumnya tidak membentuk spora, *saccharolytic*, umumnya anaerob, tidak mengganggu ekosistem tubuh, hidup dan tumbuh didalam usus (Fuller, 2009). Salah satu kelompok bakteri yang berperan sebagai probiotik adalah bakteri asam laktat yang kelompok bakteri Gram positif, tidak berspora, berbentuk bulat atau batang dan dapat mengubah karbohidrat menjadi asam laktat (Khorhenen, 2010).

Fungsi bakteri asam laktat pada pencernaan kelinci untuk menghambat pertumbuhan koloni bakteri patogen serta menguntungkan untuk aktivitas flora normal dipencernaan (Soeharsono, 2003). Menurut FAO pada tahun 1997 penyakit pencernaan pada kelinci bisa terjadi seperti enteritis dengan gejala klinis seperti diare, diare merupakan ancaman ekonomi yang serius terutama pada kelinci yang disapih muda, disebabkan oleh bakteri pathogen seperti *Salmonella*, *Corynebacteria*, *Clostridium*, *Pasteurella* dan beberapa serotipe *E. coli*.

Manfaat pemberian probiotik pada ternak dilaporkan oleh peneliti terdahulu dapat berupa peningkatan bobot badan dan penurunan insiden diare pada ternak sapi. Meskipun demikian hasil penelitian yang kontradiktif juga masih dijumpai misalnya pemberian probiotik tidak bisa mencegah diare dan tidak menunjukkan peningkatan pertumbuhan ternak secara nyata (Anggraeny, 2001).

Menurut Setiasih (2001) Efektivitas penggunaan probiotik sangat tergantung kepada sifat khas probiotik yang bersangkutan dalam beradaptasi di sepanjang saluran pencernaan. Sifat-sifat khas tersebut antara lain tahan terhadap

perubahan keasaman, sekresi garam empedu. Kemampuan adaptasi terhadap perubahan suhu merupakan sifat khas yang dibutuhkan agar probiotik tersebut dapat disimpan atau dikemas pada kondisi suhu yang beragam. Untuk memperoleh spesies yang sesuai bagi induk semang harus mampu beradaptasi terhadap perubahan keasaman dan sekresi garam empedu di dalam saluran pencernaan.

Pengelompokan bakteri asam laktat menjadi kontroversi, dulu dikelompokkan menjadi genus *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* dan *Lactobacillus* berdasarkan morfologi dan sifat biokimianya (Salminen *et al.*, 2004). Namun, sekarang bakteri asam laktat dikelompokkan menjadi 20 genus. Dalam bidang teknologi pangan, genus yang penting yaitu *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leucostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tertragenococcus*, *Vagococcus* dan *Weissella*. Pengelompokan bakteri asam laktat menjadi berbagai genus secara umum berdasarkan morfologi, bentuk fermentasi glukosa, pertumbuhan pada suhu yang berbeda, bentuk/ susunan asam laktat yang dihasilkan, kemampuan untuk tumbuh pada konsentrasi garam tinggi, toleransi terhadap asam dan basa, komposisi asam lemak, dan penyusun dinding sel (Salminen, *et al.*, 2004). Metode karakterisasi BAL yang umum dilakukan meliputi morfologi koloni, bentuk sel, motilitas, pewarnaan Gram, endospora, uji katalase, dan oksidase sesuai dengan buku Manual for the Identification of Medical Bacteria (Cowan & Steels, 1993). Contoh penemuan bakteri asam laktat pada saluran pencernaan ternak ruminansia pada tesis yenny nur anggraeny dan setiasih tahun 2001.

Bakteri asam laktat merupakan kekayaan alam yang tersebar di Indonesia, namun koleksi bakteri asam laktat asli Indonesia (indigenus) masih terbatas. Eksplorasi bakteri asam laktat dari lingkungan alam Indonesia dilakukan untuk meningkatkan koleksi bakteri asam laktat asli Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan karakterisasi BAL asal kolon kelinci sebagai kandidat probiotik

1.2 Rumusan Masalah

Berdasar latar belakang yang telah diuraikan, didapatkan rumusan permasalahan sebagai berikut:

- 1) Jenis genus BAL apakah yang ditemukan dikolon kelinci ?
- 2) Bagaimana karakteristik BAL yang diisolasi dari kolon kelinci berdasar analisa mikrobiologi dan di uji dendogram?
- 3) Apakah BAL asal kolon kelinci berpotensi sebagai probiotik berdasar uji tahan asam dan uji garam empedu?

1.3 Batasan Masalah

Berdasar latar belakang yang telah diuraikan, penelitian ini dibatasi pada:

- 1) Kelinci jantan yang digunakan berasal dari peternakan Bapak Winarto Karangploso-Malang yang berumur kurang lebih 35 hari dengan berat badan 850 gram dalam kondisi sehat dan tanpa perlakuan.
- 2) Sampel diisolasi dari kolon kelinci dengan dua perlakuan yaitu, cara kerok dibagian kolon secara aseptis dan dilakukan isolasi dengan bilasan kolon.
- 3) Metode kulturasi dilakukan pada media MRSA dan karakterisasi bakteri meliputi pengamatan secara mikroskopis, melalui uji morfologi, fisiologi

dan biokimiawi berdasarkan *Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria*.

- 4) Uji potensi BAL sebagai probiotik dengan cara melakukan uji tahan asam dan ketahanan terhadap garam empedu.

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka tujuan dari penelitian ini adalah :

- 1) Mengetahui genus hasil isolasi BAL pada kolon kelinci (*Oryctolagus Cuniculus*).
- 2) Mengetahui karakteristik BAL berdasar mikrobiologi dan uji similaritas dendogram.
- 3) Mengetahui potensi BAL sebagai probiotik dengan cara melakukan uji tahan asam dan uji tahan garam empedu.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian dengan judul isolasi dan karakterisasi BAL asal kolon kelinci (*Oryctolagus Cuniculus*) sebagai kandidat probiotik dapat dijadikan sumber wawasan pengetahuan dalam pemanfaatan probiotik sebagai suplemen kesehatan bagi kelinci dan dapat menjadi acuan penelitian berkelanjutan terkait perkembangan isolat BAL sebagai kandidat yang berpotensi sebagai probiotik.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mikroflora Saluran Pencernaan Kelinci (*New Zealand White*)

Ras *New Zealand White* (NZW) merupakan kelinci albino, tidak mempunyai bulu yang mengandung pigmen. Bulunya putih mulus, padat, tebal dan agak kasar kalau diraba serta matanya berwarna merah. Kelinci albino berasal dari *New Zealand*, sehingga disebut NZW. Keunggulan dari kelinci *New Zealand White* adalah pertumbuhannya cepat. Oleh sebab itu cocok untuk ditanakkan sebagai penghasil daging komersial. Bobot anak kelinci NZW umur 58 hari sekitar 1,8 kg, dewasa rata-rata 3,6 kg, dan bobot maksimalnya dapat mencapai 4,5 - 5 kg. Jumlah anak yang dihasilkan rata-rata 24 ekor per tahun (Sarwono, 2008). Lama bunting sekitar 31 hari dan menyusui sekitar 8 minggu (Subroto, 2003). Menurut Hustamin (2006) kelinci dalam klasifikasinya adalah sebagai berikut :

Kingdom : Animalia

Phylum : Chordata

Subphylum : Vertebrata

Classis : Mammalia

Ordo : Logomorpha

Familia : Leporidae

Genus : Oryctolagus

Species : Oryctolagus cuniculus

Kelinci adalah ternak herbivore non ruminansia dengan system pencernaan monogastrik, Sedangkan kenyataannya system pencernaan kelinci adalah sama dengan system pencernaan kuda yaitu mempunyai lambung relatif kecil, ileum yang panjang dan sekum serta kolon yang relatif besar. Lambung kelinci dibagi atas tiga bagian yaitu: *cardiaca*, *fundus* dan *pilorica* dengan pH 1,9. Volume usus kecil sekitar 10 % dari volume total alat pencernaan, dimana bagian duodenum merupakan bagian terpanjang.sekum adalah bagian yang paling besar yaitu 42% dari total volume alat pencernaan. Pencernaan zat makanan kelinci terjadi dibawah pengaruh enzim sebagaimana pada hewan monogastrik (Susilorini, 2008)

Penyapihan yang baik pada ternak kelinci jenis *New Zealand White* adalah pada umur 35 hari, ketika berat badannya mencapai 850 gram. Hal ini akan mempercepat kelahiran berikutnya. Pada umumnya kelinci melahirkan 8-10 ekor anak pada setiap kelahiran. Pada umur 4 minggu pertumbuhan anak kelinci tergantung pada konsumsi air susu induk. Tingkat kematian pada kelinci terutama pada umur muda pada saat pra sapih, sebagian besar karena ketidak mampuan induk dalam memberikan susu kepada anaknya. Sedangkan jumlah kematian setelah sapih pada umumnya disebabkan oleh kebersihan kandang, system perkandangan, suhu lingkungan, pakan dan penyakit. Kematian yang disebabkan oleh Diare akut tampak pada 1-2 hari sejak timbul gejala dan mengakibatkan tingkat kematian tinggi yaitu diatas 70% (Rukhmana, 2005).

Kelinci memfermentasikan ransum di *coecum* kurang lebih merupakan 50 persen dari seluruh kapasitas saluran pencernaannya. Walaupun mempunyai *coecum* yang besar, kelinci termasuk ternak *pseudo ruminant* yaitu *herbivora* yang tidak mampu mencerna bahan organik dan serat kasar dari hijauan sebanyak yang

dapat dicerna oleh ternak ruminansia. Di usus halus, pakan yang telah tercerna dengan baik akan diabsorpsi sedangkan pakan yang tidak mengalami absorpsi akan menuju ke *coecum* dan kolon (Sarwono, 2008).

Ransum yang tidak tercerna (serat kasar) masuk ke *caecum* dimana terdapat bakteri perombak yang akan mencernanya. *Caecum* merupakan organ yang sangat panjang dengan bagian akhir adalah *appendix*. *Caecum* dalam keadaan normal mengandung cairan dan pada periode tertentu berkontraksi untuk merombak bahan ransum tersebut sampai bagian pertama pada *colon* (Sanusi, 2006).

Menurut Astuti (2009), Saluran pencernaan semua hewan dari mulut sampai ke anus dan fungsinya adalah mencerna, mengabsorpsi, dan mengeluarkan sisa ransum yang tidak tercerna, beberapa mekanisme bahwa penyerapan lemak, karbohidrat dan protein dapat dipengaruhi oleh kehadiran mikroflora usus. Mikroflora yang menyokong kesehatan hewan terdiri dari berbagai macam spesies mikroorganisme seperti *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* dan *Bacteroides* yang sebagian besar merupakan mikroorganisme yang dominan. Semua mikroba tersebut 90%-nya tergolong flora. Kelompok lainnya adalah *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, dan *Clostridium*. Dalam kesehatan hewan, rasio jumlah mikroorganisme pada kelompok bakteri tersebut adalah penting. Diketahui bahwa mikroflora saluran pencernaan hewan dapat saling berpengaruh, misalnya oleh ingesti mikroorganisme lainnya. Hasil perlakuan tersebut dapat merubah jumlah keberadaan mikroorganisme, menghasilkan lingkungan yang cocok bagi bagi kolonisasi mikroba, yang pada akhirnya berpotensi bagi berkembangnya mikroorganisme pathogen (Abun, 2008).

2.2 Bakteri Asam Laktat Sebagai Probiotik

Secara umum BAL didefinisikan sebagai kelompok bakteri Gram positif, tidak menghasilkan spora, berbentuk bulat atau batang. Beberapa jenis bakteri asam laktat ada yang digolongkan ke dalam bakteri probiotik, seperti *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, dan *Streptococcus*. Bakteri asam laktat yang digolongkan ke dalam probiotik harus memiliki aktifitas antimikroba terhadap beberapa mikroorganisme tertentu, toleran terhadap asam lambung, dan tidak berbahaya. Bakteri asam laktat (BAL) merupakan salah satu bakteri yang dihasilkan selama proses fermentasi karbohidrat. Bakteri ini dapat memproduksi asam laktat, asam asetat, etanol, dan CO₂. Aktifitas bakteri ini dapat menyebabkan penurunan pH dimana bakteri patogen tidak dapat tumbuh pada pH yang rendah (Nurisva, 2013). Spesies mikroba yang umum digunakan sebagai probiotik adalah *Lactobacillus*, *Bifidobacteria*, *Enterococcus*, *Saccharomyces*, dan *Lactococcus* (Gibson, 2000).

Bakteri Asam Laktat (BAL) adalah kelompok bakteri yang mampu mengubah karbohidrat (glukosa) menjadi asam laktat. Efek bakterisidal dari asam laktat berkaitan dengan penurunan pH lingkungan menjadi 3 sampai 4,5 sehingga pertumbuhan bakteri lain termasuk bakteri pembusuk akan terhambat. Efektivitas BAL dalam menghambat bakteri pembusuk dipengaruhi oleh kepadatan BAL, strain BAL, dan komposisi media. Selain itu, produksi substansi penghambat dari BAL dipengaruhi oleh media pertumbuhan, pH, dan temperature/suhu lingkungan (Amin, 2001). Bakteri asam laktat merupakan kelompok bakteri yang mempunyai kemampuan untuk membentuk asam laktat dari metabolisme karbohidrat dan tumbuh pada pH lingkungan yang rendah. Secara ekologis kelompok bakteri ini

sangat bervariasi dan anggota spesiesnya dapat mendominasi macam-macam makanan, minuman atau habitat lain. Bakteri asam laktat pada dasarnya mempunyai kesamaan sifat sebagai berikut: (1) berbentuk batang atau kokus (2) karakteristik gram positif, (3) tidak membentuk spora, (4) tidak motil, (5) tidak membentuk pigmen, (6) katalase negatif karena tidak mampu menghasilkan enzim katalase, (7) tumbuh pada larutan garam, gula dan alkohol tinggi, (8) tumbuh pada kisaran pH 3,0 – 8,0, (9) tumbuh pada berbagai suhu antara 5°C sampai 50°C dan (10) asam laktat sebagai senyawa utama hasil fermentasi karbohidrat (mono dan disakarida) (Amin, 2001). Bakteri asam laktat juga memproduksi asam volatil dan CO₂. Disamping itu, BAL juga mempunyai sifat umumnya tidak bergerak, kebanyakan bersifat anaerob fakultatif. Berdasarkan atas tipe fermentasinya, BAL dibagi atas dua kelompok yaitu bakteri yang bersifat homofermentatif yang hanya menghasilkan asam laktat sebagai hasil metabolisme gula dan bakteri yang bersifat heterofermentatif yang menghasilkan asam laktat, sedikit asam asetat, etanol, ester, keton dan karbondioksida (CO₂) (Fardiaz, 2002). Asam-asam organik yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat dapat menyebabkan penurunan pH media sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Pada kondisi normal sesungguhnya lambung sudah dalam keadaan asam pH kurang dari 4,5, namun demikian penghambatan oleh asam lambung menjadi kurang efektif apabila laju aliran pakan terlalu cepat (Fardiaz, 2002).

Persyaratan bakteri asam laktat (BAL) yang dapat digunakan sebagai agensia probiotik selain harus merupakan penghuni tetap jalur pencernaan, bakteri ini harus memiliki sifat: toleran terhadap asam atau empedu, mampu tumbuh dengan cepat dan memproduksi asam dalam jumlah besar pada jalur intestine,

memproduksi substansi antimikroba yang dapat menekan patogen intestin, mempunyai kemampuan untuk menempel pada sel epitel usus (Gilliand 2001)

2.3 Karakteristik Probiotik

Satu dari alasan penggunaan probiotik yaitu untuk menstabilkan mikroflora pencernaan dan berkompetisi dengan bakteri patogen, dengan demikian strain probiotik harus mencapai usus dalam keadaan hidup dalam jumlah yang cukup. Secara umum, ada beberapa karakteristik dan kriteria keamanan yang harus dimiliki oleh probiotik. Karakteristik dan kriteria yang aman dari probiotik (Gaggia et al., 2010): 1. Nontoksik dan nonpatogenik, 2. Mempunyai identifikasi taksonomi yang jelas, 3. Dapat hidup dalam spesies target, 4. Dapat bertahan, berkolonisasi dan bermetabolisme secara aktif dalam target yg ditunjukkan dengan: a) Tahan terhadap cairan pencernaan dan empedu b) Persisten dalam saluran pencernaan c) Menempel pada ephitelium atau mucus d) Berkompetisi dengan mikroflora inang 5. Memproduksi senyawa antimikrobia 6. Antagonis terhadap patogen 7. Dapat merubah respon imun 8. Tidak berubah dan stabil pada waktu proses penyimpanan dan lapangan 9. Bertahan hidup pada populasi yang tinggi 10. Mempunyai sifat organoleptik yang baik.

2.3.1 Ketahanan terhadap asam lambung

Kelinci adalah hewan yang mempunyai sistem lambung sederhana (tunggal) dengan perkembangan *caecum* dan *colon* seperti pada alat pencernaan ruminansia, sehingga kelinci disebut ruminansia semu (pseudoruminat). Dengan sistem pencernaan tersebut kelinci dapat mencerna serat kasar, terutama cellulosa dan bahan nabati dengan bantuan bakteri yang hidup dalam *caecum* (Suwarsono, 2001).

Ketahanan asam lambung merupakan syarat penting suatu isolat untuk menjadi kandidat probiotik. Hal tersebut disebabkan bila isolat tersebut masuk ke saluran pencernaan, maka ia harus bertahan terhadap pH asam lambung yaitu sekitar 2,5. Lambung kelinci memiliki pH 1-2 dan pH lambung pada fase penyapihan pada pH 5,0-6,5 (Cathy A. Johnson-Delaney, 2006).

Menurut Chou dan Weimer (2000), stress bakteri probiotik di mulai dari lambung, dimana bakteri ini harus mampu bertahan terhadap pH yang sangat rendah. Waktu yang dibutuhkan bakteri mulai masuk sampai keluar lambung adalah 90 menit. Menurut Jacobsen et al., (2000), semua bakteri yang berhasil bertahan pada kondisi pH rendah dinyatakan bersifat tahan atau resisten terhadap asam.

Bahan untuk uji ketahanan terhadap kondisi saluran pencernaan digunakan media MRSB (deMan Rogosa and Sharp Broth, Oxoid, England), MRSA (deMan Rogosa and Sharp Agar, Oxoid, England), BPW (Buffer peptone water; Merck, Germany), HCl 4N, dan garam oxgall 0,3 % (Sigma). Peralatan utama yang digunakan adalah autoklaf, inkubator CO₂, timbangan analitik, refrigerator, vortex, pipet mikro, bunsen, pH meter, pinset, stomacher, tabung elemeyer 50 ml tutup asa, loop inoculation (ose) dan cabinet laminar.

2.3.2 Ketahanan terhadap garam empedu

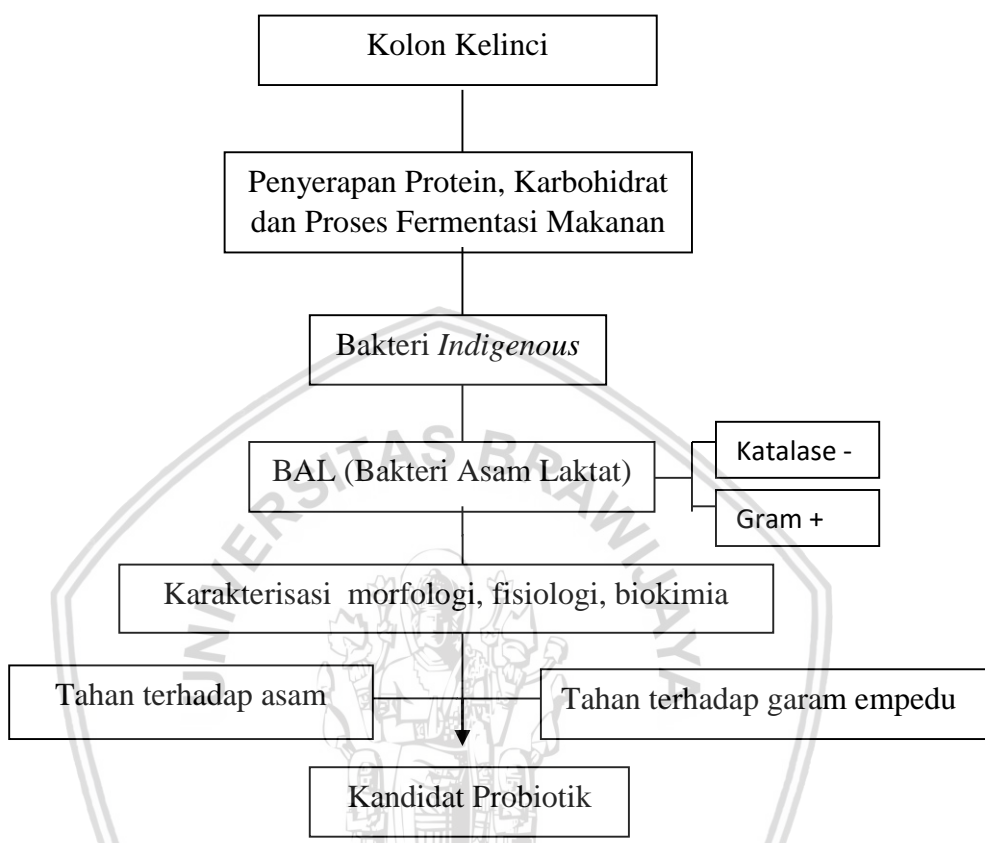
Menurut Chou dan Weimer (2000), setelah bakteri probiotik berhasil melalui lambung, mereka akan memasuki saluran usus bagian atas yang merupakan tempat garam empedu disekresikan. Galur-galur BAL dari spesies yang sama serta di isolasi dari sumber yang sama, memiliki keragaman pada toleransi terhadap garam empedu. Menurut Zavaglia et al., (2008), konsentrasi garam empedu 0,3%

merupakan konsentrasi yang cukup tinggi untuk menyeleksi galur yang resisten terhadap garam empedu, dan semua mikroba yang berhasil hidup setelah ditumbuhkan dalam MRSA (deMan Rogosa Sharpe Agar) yang ditambah 0,3% Oxgall, dinyatakan bersifat tahan terhadap garam empedu.

Mekanisme penghambatan garam empedu terhadap pertumbuhan bakteri disebabkan karena garam empedu memiliki struktur amphipatik sehingga mampu melarutkan atau memecah semua substansi sel yang mengandung lipid. Dinding sel bakteri dan membran sel bakteri mengandung lipid sehingga masuknya garam empedu ke dalam dinding sel dan membran sel akan menyebabkan dinding sel dan membran sel menjadi rusak dan kehilangan fungsinya sebagai pelindung bakteri dan filter. Apabila bakteri mengalami kerusakan atau kehilangan fungsi pada dinding selnya, maka akan mengakibatkan bakteri cenderung tidak mampu bertahan terhadap tekanan osmotik sehingga menyebabkan terjadinya lisis atau pengeluaran isi sel yang berakibat kematian sel (Mourad dan Eddine, 2006).

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka konsep



Gambar. 3.1 Skema Kerja Konsep

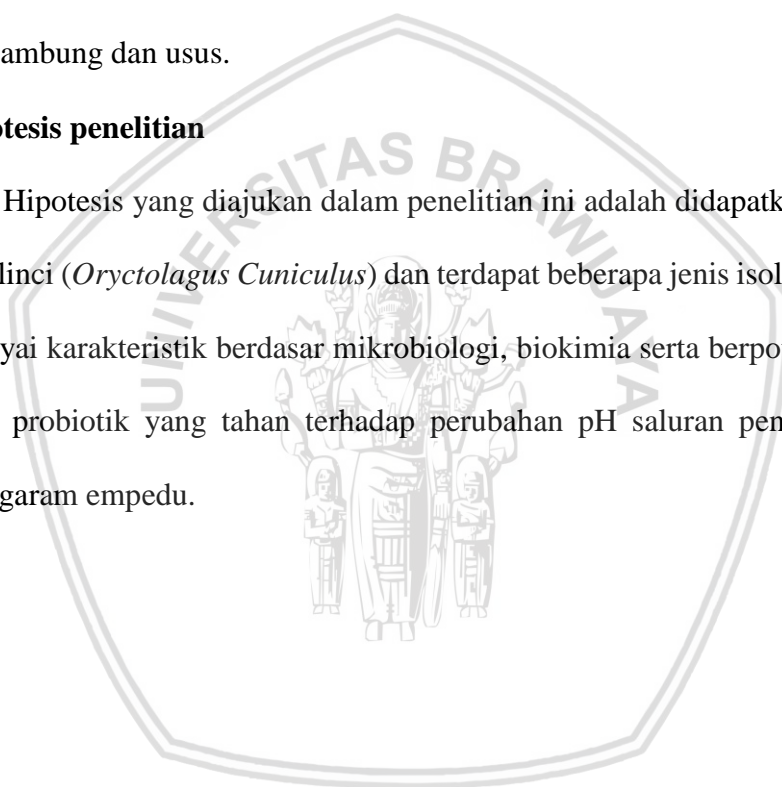
Kolon kelinci merupakan bagian saluran pencernaan yang merupakan tempat penyerapan protein, karbohidrat dan proses fermentasi makanan. Bakteri asam laktat yang terdapat pada kolon berfungsi untuk menjaga keseimbangan flora normal. Bakteri asam laktat (BAL) adalah kelompok bakteri gram positif berbentuk kokus atau batang, suhu optimum $\pm 40^{\circ}\text{C}$, pada umumnya tidak motil, bersifat anaerob, katalase negatif dan oksidase positif, dengan asam laktat sebagai produk utama fermentasi karbohidrat. Sifat-sifat khusus bakteri asam laktat adalah mampu tumbuh pada kadar gula, dan garam yang tinggi, mampu memfermentasikan monosakarida dan disakarida. Hampir semua BAL hanya

memperoleh energi dari metabolisme gula sehingga habitat pertumbuhannya hanya terbatas pada lingkungan yang menyediakan cukup gula atau bisa disebut dengan lingkungan yang kaya nutrisi. Mendapatkan isolat bakteri asam laktat diperlukan uji karakterisasi dan uji potensi untuk mendapatkan kandidat probiotik. Uji karakterisasi meliputi uji morfologi, fisiologi dan biokimiawi. Uji morfologi dilakukan dengan dua cara yaitu secara mikroskopik dan makroskopik, secara makroskopik (mata telanjang) dilakukan dengan cara visual yang diamati adalah karakteristik koloni bakteri asam laktat meliputi: bentuk koloni, elevasi, bentuk tepi, struktur dalam, pertumbuhan pada media miring, dan motilitas. Secara mikroskopis (menggunakan mikroskop) bakteri asam laktat dapat kita amati : bentuk sel, susunan sel dengan menggunakan mikroskop pada perbesaran 1000x dengan cara melakukan pewarnaan gram, bakteri asam laktat merupakan bakteri Gram positif. Bakteri Gram positif akan memberikan warna ungu ketika di beri cat Gram. Uji fisiologi meliputi suhu dan pH, uji ini dilakukan untuk mengetahui faktor abiotik yang dapat mempengaruhi pertumbuhan bakteri. Apabila faktor-faktor abiotik tersebut memenuhi syarat pertumbuhan optimum bakteri, maka bakteri dapat tumbuh dan berkembang biak. Pengujian suhu dilakukan pada suhu inkubasi 15° C, 37° C, dan 45°C untuk mengetahui sifat bakteri dan pengaruh suhu terhadap jumlah sel BAL. Pengujian pH dilakukan untuk mengetahui pengaruh pH terhadap jumlah sel BAL. Uji biokimia meliputi uji katalase, uji katalase merupakan uji untuk mengidentifikasi mikroba yang mampu menghasilkan enzim katalase yang digunakan untuk memecah hidrogen peroksida yang terbentuk dari proses respirasi aerob dan bersifat toksik terhadap bakteri, menjadi hidrogen oksida (H₂O) dan oksigen (O₂) yang tidak bersifat toksik lagi. Karakteristik bakteri asam

laktat harus bersifat katalase negatif yaitu tidak terbentuk buih setelah di tetesi hydrogen peroksida 3% atau tidak mempunyai enzim katalase. Hal ini sesuai dengan karakteristik dari bakteri asam laktat. Untuk uji potensi dilakukan dua cara yaitu uji tahan asam lambung dan uji tahan garam empedu, toleransi bakteri asam laktat terhadap garam empedu pada konsentrasi 0,3% merupakan konsentrasi kritis untuk menyeleksi isolat yang resisten terhadap garam empedu. Uji tahan asam lambung dilakukan untuk mengetahui BAL mampu bertahan hidup lama ketika melalui lambung dan usus.

3.2 Hipotesis penelitian

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah didapatkan BAL asal kolon kelinci (*Oryctolagus Cuniculus*) dan terdapat beberapa jenis isolat BAL yang mempunyai karakteristik berdasar mikrobiologi, biokimia serta berpotensi sebagai kandidat probiotik yang tahan terhadap perubahan pH saluran pencernaan dan sekresi garam empedu.



BAB 4 METODOLOGI DAN PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kesmavet FKH Universitas Brawijaya Malang, Mikrobiologi FKH Universitas Brawijaya Malang, Bioteknologi FTP Universitas Brawijaya Malang dan LSIH Universitas Brawijaya Malang. Pelaksanaan berlangsung selama 8 bulan mulai bulan September 2015 – April 2016.

4.2 Bahan dan Alat Penelitian

4.2.1 Bahan Penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel kolon kelinci jantan yang berumur 35 hari dengan berat badan 850 gram dari peternakan Bapak Winarto Karangploso-Malang. Pengambilan sampel dilakukan dengan dua cara yaitu, Sampel yang tidak menempel pada kolon (*New Zealand White*) yang di cuci dengan BPW dan Sampel yang menempel pada kolon kelinci (*New Zealand White*) yang didapatkan dengan cara dikerok dinding mukosa kolon bagian dalam kelinci. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain adalah larutan MRS agar, MRS broth, NaCl fisiologis, Nutrient broth, Alkohol 96%, BPW, CaCo3, Aquades, kolon kelinci, NAP, *Metilen blue*, Iodin, Oil emersi, Kapas, Lar. H₂O₂, Kit oxidase, *Tryptone broth*, Larutan asam sulfanilat, Lar. Dimetil alfa-naphtylamin, Soluble strach, OH basal medium, Minyak parafin steril, Beef ekstrak, Pepton. HCL (pH 2), NaOH (pH8). Pewarnaan gram (Kristal violet dan safranin), lugol.

4.2.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain adalah cotton swab, cawan petri, tabung reaksi, backer glass, tabung erlemeyer, gelas ukur, pengaduk kaca, ose, blue pipet, mikropipet, bunsen, tusuk gigi, timbangan, alumunium voil, inkubator, mikroskop cahaya, objek glass, cover glass, cotton swab, cawan petri, tabung durham, anaerobic jar (Analyte pty.ltd. Australia), spektrofotometer (*spectronic 21*), *autoklaf*, *Bunsen bruner*, *automatic micropippete volume 200 µl- 1000µl* (Boeco Jerman), *colony counter*, pH meter, *object glass* dan botol media.

4.3 Tahapan Penelitian

Penelitian ini terdiri atas empat tahapan, yaitu: (1) Isolasi bakteri asal kolon kelinci, (2) Pengamatan morfologi BAL, uji katalase negatif dan pewarnaan gram positif, pemurnian dan perhitungan koloni BAL, (3) Karakterisasi BAL fisiologi dan biokimiawi, (4) uji potensi bakteri asam laktat (BAL) sebagai kandidat probiotik secara in vitro.

4.4 Prosedur Kerja

4.4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain true experimental laboratory secara deskriptif. Tahapan pertama yaitu isolasi BAL asal kolon kelinci *New Zealand White*. Isolasi BAL dari kolon kelinci dilakukan tiga kali ulangan. Masing-masing ulangan dilakukan duplo. Tahap kedua yaitu Pengamatan morfologi BAL yang dilanjutkan uji katalase negatif dan uji pewarnaan gram sebagai konfirmasi isolat bakteri asam laktat asal kolon kelinci, kemudian dilanjutkan pemurnian bakteri dan perhitungan koloni BAL. Tahap ketiga yaitu karakterisasi yang dilakukan berdasarkan fisiologi dan uji biokimiawi. Tahap empat adalah uji potensi terhadap

kemampuan adaptasi BAL pada kondisi saluran pencernaan kelinci yang meliputi: Ketahanan hidup terhadap pH asam saluran pencernaan kelinci yaitu pH2 di dalam lambung, serta ketahanan hidup terhadap sekresi garam empedu. Identifikasi bakteri terhadap isolat BAL berpedoman pada buku Bergey's Determinative Bacteriology (Holt *et al.*, 1994). Kriteria koloni yang diduga BAL (warna putih, kecil, dan tepian jelas) serta koloni yang memiliki zona yang luas dan bening juga diduga sebagai koloni BAL dikarenakan penanaman menggunakan MRSA+ CaCo3 1 % serta tumbuh terpisah. Diagram alir skema penelitian dapat dilihat pada lampiran 1.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah kelinci jantan (*New Zealand White*) dengan berat badan 850 gram dan berusia 35 hari. Kelinci yang digunakan adalah kelinci sehat yang ditandai dengan nafsu makan baik dan perilaku normal. Jumlah sampel yang digunakan sebanyak tiga ekor kelinci jantan dengan diambil satu segmen kolon yang diambil sampel pada air cucian kolon dan kerokan kolon.

4.4.2. Pengambilan sampel kolon kelinci

Pengambilan sampel dilakukan di laboratorium LSIH dengan cara menggunakan tiga kelinci dengan cara memasukkan kedalam toples yang sudah berisi kloroform 10%. Pastikan kelinci mati dan segera lakukan pembedahan, syarat kelinci sudah tidak bernyawa dilakukan diagnosa klinik dengan cara melihat reflek pupil mata terhadap cahaya, jika tidak ada respon maka dipastikan kelinci sudah tidak bernyawa. Pengambilan sampel kolon dilakukan dengan beberapa cara pengambilan sampel kolon agar mendapat sampel yang representatif. Sampel yang diambil adalah kolon, pengambilan segmen secara representative dengan cara

mengambil bagian proksimal, median dan terminal dari kolon. Sebelum dipotong, sampel diikat terlebih dahulu dengan benang untuk menghindari kontaminasi dan mempertahankan kondisi mikroaerofilik. Sampel kolon diidentifikasi di laboratorium LSIH.

4.4.3 Isolasi dan perhitungan BAL asal kolon kelinci

Preparasi sampel air cucian asal kolon yaitu: dilakukan pemotongan kolon berukuran 10 cm, dipotong dari kolon bagian proksimal sampai terminal. Kolon yang telah dikeluarkan isinya direndam dalam buffered pepton water steril (BPW) sebanyak 100 ml dan dibiarkan selama 30 menit pada suhu 4 °C dengan tujuan menghilangkan mukus. Setelah 30 menit, usus dicuci dengan BPW dan air cucianya ditampung pada tempat yang sama. Air bekas rendaman dan cucian kolon ini digunakan sebagai sampel dengan pengenceran berseri (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) menggunakan buffered pepton water steril (BPW), untuk 1 ml sampel kolon ditambah 9 ml BPW. Hasil pengenceran ditanam pada media selektif MRSA+ CaCO₃ 1% secara *pour plate* (Khunajakr *et al.*, 2008), setelah agar memadat, cawan petri diinkubasi pada suhu 40°C- 43°C selama 24 jam. Perhitungan koloni BAL dilakukan dengan cara menemukan koloni yang menunjukkan clearing zone.

Preparasi sampel kerokan dinding mukosa kolon yaitu: sampel kolon kerokan diambil sebanyak 1 gram. Sampel yang berhasil dikoleksi dilakukan pengenceran berseri (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) menggunakan buffered pepton water steril, untuk 1 gram sampel dari kolon ditambah 9 ml BPW. Hasil pengenceran ditanam pada media selektif MRSA+ CaCO₃ 1% secara *pour palte* (Khunajakr *et al.*, 2008), setelah agar memadat, cawan petri diinkubasi pada suhu

40°C- 43°C selama 24 jam. Perhitungan koloni BAL dilakukan dengan cara menemukan koloni yang menunjukkan clearing zone.

4.4.4. Seleksi dan Pemurnian BAL asal kolon kelinci

Seleksi BAL dilakukan berdasarkan hasil uji ketalase negatif dan uji gram positif. Pemurnian BAL dilakukan dengan melakukan pengamatan morfologi koloni yang tumbuh pada media MRSA+CaCO₃ 1%. Koloni BAL akan menunjukkan daerah bening disekitarnya, karena pembentukan asam yang bereaksi dengan adanya kandungan CaCO₃ pada media MRS Agar. Selanjutnya koloni yang bersifat katalase negatif dan gram positif ditumbuhkan dalam media cair MRS secara mikroaerofilik pada suhu 37°C selama 48 jam. Tahap selanjutnya dilakukan pemurnian dengan metode agar gores pada medium MRS Agar dengan goresan kuadran dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam dengan (Lay, 2004). Penggoresan dilakukan beberapa kali sampai didapatkan koloni tunggal. Setiap melakukan goresan kuadran, koloni terpilih ditumbuhkan pada agar miring dan dilakukan pengujian terhadap morfologi sel yang meliputi bentuk sel dan pewarnaan gram. Jika dari hasil pengujian tersebut diperoleh hasil yang sama dengan pengujian morfologi sel pada tahap sebelumnya, maka dapat dinyatakan bahwa bakteri tersebut telah murni (Suharjono dkk, 2011).

4.4.5 Karakterisasi BAL asal kolon kelinci

Perlakuan karakterisasi pada isolat BAL untuk mengetahui sifat morfologi, fisiologis dan biokimiawi. Pada penelitian ini untuk karakterisasi bakteri berpedoman pada buku Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria. Pengamatan uji morfologi adalah dengan mengamati morfologi koloni dan

morfologi sel yang dilakukan pewarnaan gram serta melihat motilitas bakteri, untuk prosedur pengamatan motilitas bakteri dapat dilihat pada lampiran 2. Untuk pengamatan pada uji morfologi bisa dilakukan langsung pada tahap seleksi dan pemurnian BAL. Pengamatan fisiologis adalah kemampuan tumbuh pada suhu 15°C, 37°C dan 45°C. Pengamatan uji biokimiawi untuk menentukan BAL meliputi: uji katalase, oksidase, indole, reduksi nitrat, hidrolisis pati, oksidatif-fermentatif dan uji fermentasi glukosa. Holt, Krieg, Sneath, Staley dan Williams (2004), menyatakan bahwa karakteristik BAL adalah gram positif, mikroaerofilik, berbentuk sel batang atau bulat, katalase negatif, tidak mereduksi nitrat, mampu menghasilkan asam dari glukosa, ada yang bersifat heterofermentatif (menghasilkan gas) dan ada yang bersifat yang bersifat homofermentatif (tidak menghasilkan gas).

4.4.5.1 Pengujian pertumbuhan pada suhu

Kemampuan BAL untuk tumbuh pada suhu 15°C dan suhu 45°C merupakan karakteristik BAL, meskipun suhu pertumbuhan optimalnya adalah 37°C. Isolat BAL ditumbuhkan pada MRS broth Pengujian pertumbuhan dengan suhu 15°C menggunakan refrigerator, suhu 45°C menggunakan inkubator. Pengamatan dilakukan dengan berbagai macam suhu, suhu pertumbuhan optimal 37°C, suhu kemampuan tumbuh 15°C dan 45°C. Sebanyak 1 ose, masing-masing isolat bakteri dari stok kultur di inokulasikan pada media MRSB dalam tabung reaksi dan inkubasi pada suhu 15°C, 37°C dan 45°C selama 24 jam. Hasil Positif apabila terjadi pertumbuhan bakteri pada medium dan hasil negative apabila tidak terjadi pertumbuhan bakteri pada medium (Dalgaard dan Koutsomanis, 2001)

4.4.5.2 Pengujian Sifat Biokimia BAL

Pengujian biokimia bakteri yang dilakukan menurut Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Lippincott Williams and Wilkins, 2000) meliputi:

- **Uji katalase**

Uji katalase menggunakan larutan H_2O_2 3% sebanyak satu tetes dan diletakkan diatas objek glass dan campurkan diatasnya satu ose kultur BAL. Reaksi positif uji katalase ditunjukkan dengan membentuk gelembung gelembung yang berarti ada pembentukan gas Oksigen (O_2) sebagai hasil pemecahan H_2O_2 oleh enzim katalase yang diproduksi oleh bakteri tersebut atau bila setelah tetesan *Hydrogen Peroxide* maka akan timbul gelembung gas yang menunjukkan terjadi pelepasan oksigen yang berarti positif. Bakteri asam laktat termasuk bakteri katalase negatif, sehingga hasil reaksi uji katalase tidak terbentuk gelembung udara yang berarti tidak terbentuk gas (Suryani, 2010). Menurut Sneath dkk (2000), berdasar Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, kelompok bakteri asam laktat berbentuk batang yang mempunyai katalase negatif dan hasil pengecatan Gram bersifat positif merupakan bakteri asam laktat genus *Lactobacillus*

- **Uji Oksidase**

Uji oksidase dengan cara menggoreskan satu kultur ose BAL yang dikoreskan pada kit oksidase interpretasi hasil positif jika berubahnya warna koloni menjadi merah muda, merah tua, merah gelap lalu menjadi hitam atau biru, berarti hasil tes positif yang dinyatakan bahwa bakteri tersebut mengkonsumsi oksigen.

- **Uji indol**

Uji indol menggunakan media tryptone broth yang telah dipanaskan dan dihomogenkan didalam tabung reaksi dan ditanamkan satu satu ose BAL kedalam tabung dan inkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam, hasil pengujian ditambahkan dengan 0,5 ml reagen konvacs sehingga terbentuk warna merah yang menunjukkan hasil uji indole positif.

- **Uji Reduksi Nitrat**

Uji reduksi nitrat menggunakan bahan beef ekstrak, pepton dan KNO₃ dan dimasukkan seluruh bahan ke tabung durham yang didalamnya tanpa ada gelembung udara. Pengujian dengan cara mencampur tiga tetes larutan asam sulfanilat dengan tiga tetes larutan dimetil alpa-naphtylamin, pembacaan interpretasi positif jika terbentuk warna merah karena dapat mereduksi nitrat menjadi nitrit oleh mikroorganisme. Isolat Bal yang digunakan dalam uji reduksi nitrat ini adalah isolate muda (usia 24 jam dalam media cair MRS yang di inkubasi secara mikroaerofilik).

- **Hidrolisis Pati**

Hidrolisis pati menggunakan media agar, beef ekstrak dan soluble starch yang dilarutkan pada aquades selanjutnya disterilkan dengan autoclave dengan suhu 121 °C selama 15 menit dengan tekanan 2 Atm, inokulasikan pada cawan petri dan inkubasi 37°C selama 24 jam. Pengujian dilakukan dengan menambahkan satu tetes larutan iodin diatas permukaan isolat bakteri, dan jika tampak zona bening maka hasil menunjukkan bahwa isolat BAL dapat menghirolisis pati.

- **Oksidatif-Fermentatif**

Uji oksidatif-fermentatif dengan cara menumbuhkan pada media OF basal medium dan dilarutkan dalam aquades kemudian dipanaskan dan dihomogenkan, penanaman sampel menggunakan metode tusuk agar tegak dan tabung ditutup dengan minyak parafin steril dan inkubasi 37°C selama 24 jam. Hasil menunjukkan positif jika terjadi perubahan warna menjadi kuning.

- **Uji Fermentasi Glukosa**

Uji fermentasi glukosa dilakukan dengan mengambil satu ose isolat bakteri asam laktat usia muda (usia 24 jam media cair MRS) diinokulasikan diatas media uji (glukosa dan laktosa). Kemudian diinkubasi selama 48 jam di dalam Anaerobic jar secara mikroaerofilik. Setelah waktu inkubasi selesai, diamati perubahan warna pada media dan terbentuknya gelembung udara pada tabung durham. Produksi asam ditunjukkan dengan terjadinya perubahan warna merah menjadi kuning, perubahan warna media menjadi kuning menunjukkan adanya fermentasi sedangkan terbentuknya gelembung udara pada tabung durham menunjukkan bahwa bakteri menghasilkan gas pada proses metabolismenya. Tujuannya untuk mengetahui kemampuan isolat dalam memfermentasikan beberapa jenis karbohidrat (Sutrisna, 2013). Isolat BAL yang memproduksi asam dan gas dikelompokkan sebagai BAL homofermentatif (Lay, 2004). Uji fermentasi glukosa dengan cara inokulasikan isolat BAL pada media dengan komposisi beef ekstrak, pepton dan gula yang telah dilarutkan pada aquades serta ditambahkan larutan PP kemudian diinkubasi 37°C selama 24 jam serta amati perubahan warna (merah menjadi kuning) yang menunjukkan adanya aktivitas fermentasi yang menghasilkan produk samping gas.

4.4.5.3 Identifikasi Isolat

Pembuatan dendogram menggunakan software CLAD97 dilakukan dengan mengkompilasi seluruh data yang telah diperoleh dalam uji karakterisasi morfologi, biokimia dan fisiologi tersebut dikompilasi menggunakan Microsoft Excel. Data selanjutnya dikonversi kedalam bentuk angka 1 untuk uji yang positif, dan untuk hasil uji yang negative dikonversi menjadi angka 0. Data yang telah diubah tersebut kemudian diolah menggunakan CLAD97.

4.4.6 Uji Potensi BAL sebagai Probiotik

4.4.6.1 Uji Ketahanan Asam dan Pengaruh perubahan pH

Uji potensi sebagai kandidat probiotik yang dilakukan dalam penelitian ini adalah menguji kemampuan adaptasi (ketahanan hidup terhadap asam lambung dan perubahan pH saluran pencernaan) secara *in-vitro*. Uji potensi meliputi uji ketahanan BAL terhadap ketahanan asam lambung dengan metode isolat BAL diinokulasikan pada media MRS borth kemudian ditambahkan HCL 0,01 N dengan (pH 2) yang disesuaikan dengan pH lambung, selanjutnya hasil inokulasi di inkubasi mikroaerofilik dengan suhu 37°C selama 3 jam. Setelah diinkubasi, sel yang bertahan hidup dihitung dengan cara ditumbuhkan kembali dalam media agar MRS dengan metode agar tuang yang diinkubasi secara mikroaerofilik selama 48 jam pada suhu 37°C. Jumlah koloni BAL yang tumbuh pada masing-masing perlakuan dibandingkan dengan jumlah koloni pada 0 jam tanpa perlakuan. Pembacaan hasil positif jika terlihat pertumbuhan pada isolat media MRSA yang

telah diinkubasi. Jumlah koloni BAL yang tumbuh pada masing-masing perlakuan dibandingkan dengan jumlah koloni pada 0 jam tanpa perlakuan.

4.4.6.2 Uji Ketahanan Garam Empedu

Uji ketahanan garam empedu menggunakan isolat BAL usia 24 jam diinkubasi pada suhu 37°C secara mikroaerofilik dalam media MRS broth. Uji dilakukan dengan cara ditumbuhkan pada media MRS broth dengan oxgall sebanyak 0,3 % dan ditumbuhkan pada media MRS broth tanpa oxgall. Pertumbuhan isolat BAL diasumsikan sebagai peningkatan OD yang diamati setiap jam selama 12 jam menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm. Nilai ketahanan BAL terhadap garam empedu adalah presentase rata-rata peningkatan OD/jam isolat BAL dalam MRS broth + 0,3 % oxgall dengan peningkatan OD/jam isolat BAL dalam MRS broth tanpa garam empedu atau dengan rumus berikut:

$$\text{Ketahanan BAL terhadap garam empedu (\%)} = (X1/X2) \times 100\%$$

Keterangan :

- X1 adalah rata-rata peningkatan OD/jam isolat BAL dalam MRS broth + 0,3 % (v/v) garam empedu.
- X2 adalah rata-rata peningkatan OD/jam isolat BAL dalam MRS broth tanpa garam empedu.

4.5 Analisis data

Hasil yang diperoleh dianalisa secara deskriptif kualitatif pada uji karakterisasi fenotip dan dipilih isolat terbaik yang berpotensi sebagai kandidat probiotik dengan metode ranking.



BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat

Hasil perhitungan jumlah koloni bakteri asam laktat yang diisolasi dari kolon kelinci yang ditumbuhkan pada media MRSA menggunakan metode Total Plate Count (TPC) diketahui rata-rata jumlah BAL (cfu/ml) pada sampel 3 kolon kelinci usia 35 hari di sajikan pada tabel 5.1 berikut ini:

Tabel 5.1 Rata-rata jumlah koloni bakteri asam laktat pada kolon Kelinci

Kode Sampel	Rata-rata Jumlah Koloni Bakteri Asam Laktat (10 ⁵ CFU/mL)	
	Kerokan	Bilasan
A	1,50 ± 0,14	1,10 ± 0,14
B	3,25 ± 0,49	2,05 ± 0,07
C	4,15 ± 0,91	1,65 ± 0,21
Rata-rata	2,96 ± 0,51	1,60 ± 0,14

Keterangan: A: sampel kelinci 1 B: sampel kelinci 2 C: sampel kelinci 3

Berdasarkan tabel 5.1 diketahui bahwa sampel kerokan kolon kelinci memiliki kisaran jumlah BAL dengan rerata $2,96 \pm 0,51 \times 10^5$ cfu/ml. Nilai ini lebih tinggi dibandingkan dengan sampel bilasan kolon kelinci dengan rerata $1,60 \pm 0,14 \times 10^5$ cfu/ml. Jumlah BAL dalam kerokan kolon lebih banyak dibandingkan dengan jumlah BAL dalam bilasan kolon, hal ini karena bakteri mampu bertahan hidup dalam saluran pencernaan sehingga dapat membentuk koloni dalam saluran cerna. Kemampuan menempel BAL pada saluran pencernaan merupakan syarat penting yang harus dipenuhi oleh probiotik (FAO/WHO, 2002). Selain itu BAL sebagai mikroflora dalam usus dapat membentuk koloni di saluran cerna. Kemampuan tumbuh BAL dapat terlihat pada hasil sampel bilasan dan kerokan. Bakteri yang tumbuh pada saluran pencernaan ada yang tumbuh permanen dalam jangka waktu yang lama dan ada yang hanya tinggal sementara (transient) (Fox, 2008).

Mikroorganisme yang mengkoloni secara permanen akan membentuk ekosistem di saluran pencernaan tersebut yang akhirnya menjadi mikroorganisme penghuni saluran pencernaan (Haveenar, 2006).

Karakterisasi bakteri dilanjutkan pada uji berikutnya yaitu dengan pewarnaan gram untuk mengetahui bakteri yang memiliki sifat gram positif dan gram negatif. Berdasarkan uji morfologi BAL asal kolon kelinci diperoleh 30 koloni dari sampel kerokan dan bilasan, hasil *screening* didapatkan 14 isolat BAL setelah di uji pewarnaan gram positif dan katalase negatif. Hasil karakterisasi morfologi isolat BAL asal kolon kelinci dapat dilihat pada tabel 5.2

Tabel 5.2 Morfologi koloni dan sel bakteri asam laktat asal kolon kelinci

Kode Isolat	Morfologi koloni				Morfologi sel		
	Bentuk	Tepi	Warna	Elevasi	Bentuk	Gram	Katalase
AZ	Bulat	Rata	Putih	Cembung	<i>Bacill</i>	+	-
AW	Bulat	Rata	Putih	Cembung	<i>Bacill</i>	+	-
AV	Bulat	Rata	Putih	Cembung	<i>Bacill</i>	+	-
AT	Bulat	Rata	Kekuningan	Cembung	<i>Coccus</i>	+	-
AS	Bulat	Rata	Kekuningan	Cembung	<i>Coccus</i>	+	-
BR	Bulat	Rata	Putih	Cembung	<i>Bacill</i>	+	-
BQ	Bulat	Rata	Putih	Cembung	<i>Bacill</i>	+	-
BP	Bulat	Rata	Putih	Cembung	<i>Bacill</i>	+	-
BO	Bulat	Rata	Putih	Cembung	<i>Bacill</i>	+	-
BN	Bulat	Rata	Putih	Cembung	<i>Bacill</i>	+	-
CM	Bulat	Rata	Putih	Cembung	<i>Bacill</i>	+	-
CK	Bulat	Rata	Kekuningan	Cembung	<i>Coccus</i>	+	-
CJ	Bulat	Rata	Putih	Cembung	<i>Bacill</i>	+	-
CL	Bulat	Rata	Putih	Cembung	<i>Bacill</i>	+	-

Keterangan : Positif (+) : Negatif (-)

Hasil uji pewarnaan gram didapatkan 14 isolat yang menunjukkan hasil gram positif yang ditandai dengan sel bakteri berwarna ungu serta bentuk sel yang basil dan kokus. Isolat AZ, AW, AV, BR, BQ, BP, BO, BN, CM, CJ, CL merupakan isolat yang berbentuk basil, bersifat katalase negatif dan bersifat gram positif. Isolat

AT, AS, CK merupakan isolat yang berbentuk kokus, bersifat katalase negatif dan bersifat gram positif. Menurut Gomes & Malcata (2000), BAL memiliki dua bentuk morfologi yang berbeda yakni basil dan kokus, bakteri asam laktat yang berbentuk batang tergolong *Lactobacillus* dan yang berbentuk kokus tergolong *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* dan *Pediococcus*. Pada sampel didapatkan bahwa bakteri yang diperoleh tergolong bakteri *Lactobacillus* dan bakteri *Lactococcus*.

Hasil uji katalase pada 14 isolat menunjukkan hasil negatif yang ditunjukkan dengan tidak adanya gelembung gas yang berisi oksigen ketika isolat ditetesi dengan larutan H_2O_2 , hal ini sesuai dengan penelitian Ernawati (2010) yang menyatakan bahwa bakteri asam laktat termasuk bakteri dengan katalase negatif. Uji katalase dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat dalam menghasilkan enzim katalase serta toleransi isolat terhadap oksigen. Enzim katalase merupakan enzim yang mampu mengkatalis langsung konversi hidrogen peroksida (H_2O_2) yang toksik bagi sel menjadi air dan oksigen (Raharjo, 2012).

Dwidjoseputro (2005) mengatakan bahwa pengamatan morfologi koloni meliputi bentuk koloni (dilihat dari atas) dan warna koloni bakteri. Identifikasi secara morfologi koloni dilakukan dengan cara memilih strain isolat yang berbeda setelah proses isolasi tahap pertama. Koloni yang diduga BAL berwarna putih hingga putih kekuningan, berbentuk bulat dan tepian rata.

Karakterisasi isolat dilakukan untuk mengetahui genus isolat berdasarkan sifat morfologi, fisiologis dan biokimia yang berpedoman pada buku *Manual for the identification of medical bacteria* (Barrow & Feltham, 1993) dan didapat hasil

genus *Lactobacillus* sp dan *Lactococcus* sp. Hasil Pengamatan uji-uji karakterisasi

BAL dapat dilihat pada Tabel 5.3

Tabel 5.3. Karakterisasi isolat bakteri asam laktat asal kolon kelinci

Karakteristik fenotip	Kode Isolat													
	AZ	AW	AV	AT	AS	BR	BQ	BP	BO	BN	CM	CK	CJ	CL
Suhu 15	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Suhu 37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Suhu 45	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
Oksidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motilitas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Reduksi nitrat	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrolisis pati	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
O/F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Sorbitol	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Glukosa	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
Galaktosa	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Laktosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sukrosa	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Arabinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Pendugaan Genus	<i>Lactobacillus</i> sp	<i>Lactobacillus</i> sp	<i>Lactobacillus</i> sp	<i>Lactococcus</i> sp	<i>Lactococcus</i> sp	<i>Lactobacillus</i> sp	<i>Lactobacillus</i> sp	<i>Lactobacillus</i> sp	<i>Lactobacillus</i> sp	<i>Lactobacillus</i> sp	<i>Lactobacillus</i> sp	<i>Lactococcus</i> sp	<i>Lactobacillus</i> sp	<i>Lactobacillus</i> sp

Keterangan : O :Oksidatif; F : Fermentatif; (+) :Reaksi positif; (-) :Reaksi Negatif

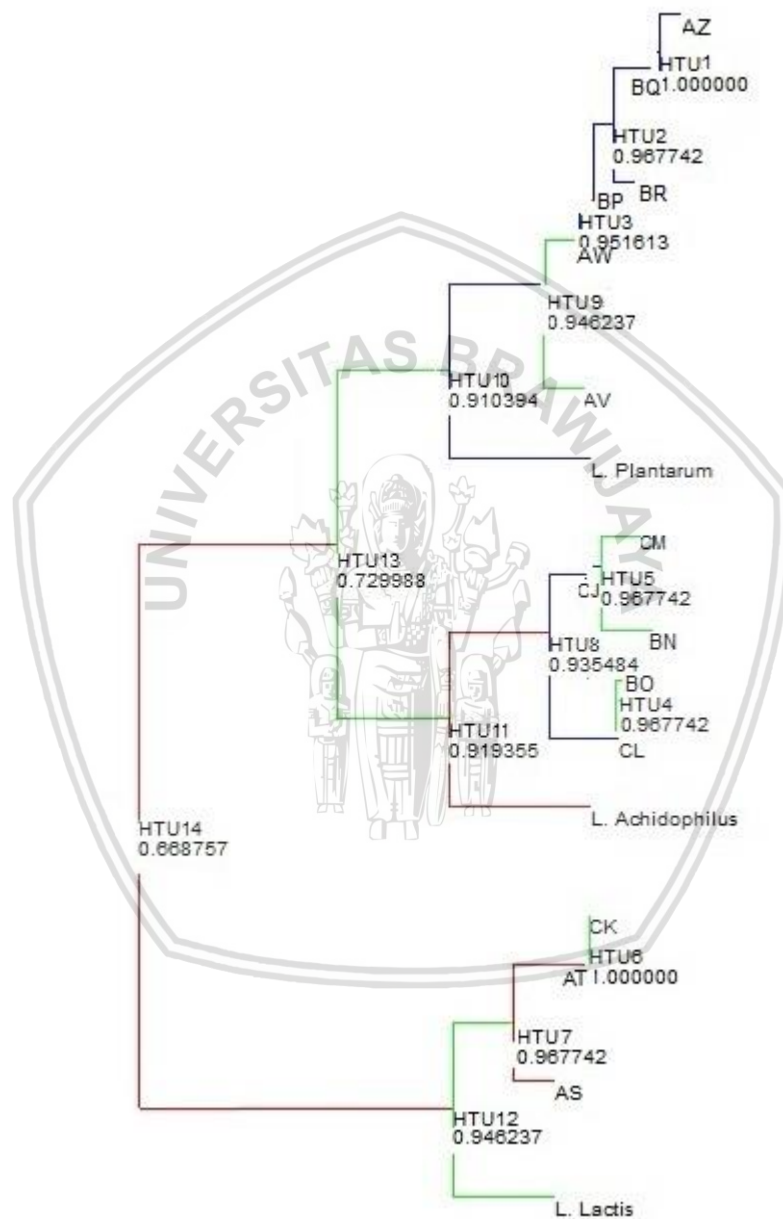
Berdasarkan tabel 5.3 didapatkan isolat AZ, AW, AV, BR, BQ, BP, BO, BN, CM, CJ dan CL yang setelah dilakukan karakterisasi memiliki karakteristik mendekati genus *Lactobacillus* sp. *Lactobacillus* sp merupakan bakteri berbentuk

basil, termasuk kedalam bakteri Gram positif, bersifat non motil, mampu tumbuh pada kondisi anaerobic (beberapa spesies bersifat anaerobic fakultatif), katalase negatif, mampu memfermentasikan glukosa (beberapa spesies dapat memfermentasikan jenis gula yang berbeda) (Barrow & Feltham, 1993). Menurut Charteris *et al.* (2001), genus *Lactobasillus sp.* merupakan bakteri gram positif yang mengandung peptodoglikan, suhu optimum pertumbuhan berkisar antara 30-40 °C.

Hasil karakterisasi isolat AT, AS dan CK memiliki karakteristik mendekati genus *Lactococcus* yang merupakan bentuk bakteri coccus, bersifat Gram positif, katalase negatif, bersifat non motil dan reduksi nitrat negatif (Barrow & Feltham, 1993). Menurut Saurdana *et al* (2007), genus *lactococcus sp.* memiliki ciri tidak dapat tumbuh pada suhu 45 °C dan suhu optimum tumbuh pada suhu 30-37 °C.

Pendugaan isolat BAL hasil karakterisasi morfologi, fisiologi dan biokimia dapat dilakukan berdasarkan nilai uji similaritas masing-masing isolat yang disajikan dalam bentuk dendogram menggunakan *Software CLAD97*. Tujuan uji similaritas untuk mengetahui jarak kedekatan antar isolat BAL hasil isolasi dengan isolat BAL acuan. Taksonomi numerik ini merupakan suatu kajian kekerabatan dengan mengaplikasikan nilai similaritas setiap karakter sehingga terdapat tingkatan kategori berdasarkan indeks similaritas. Sistem taksonomi ini digunakan sebanyak-banyaknya sifat kemudian dicari indeks similaritas dari mikrobial yang akan dikelompokkan (Boone and Castenholz, 2001). Nilai similaritas mendekati 1 menunjukkan bahwa ada kemungkinan isolat tersebut dari genus dan spesies yang sama. Suatu isolat dapat dikatakan memiliki spesies yang berbeda jika memiliki nilai similaritas kurang dari 0,7. Sedangkan isolat yang memiliki nilai similaritas

lebih dari 0,7 maka dapat dikatakan sebagai satu spesies. Nilai similaritas yang diperoleh dari 14 isolat BAL, dikelompokkan kedalam 3 kelompok bakteri yang memiliki genus dan spesies berbeda seperti pada Gambar 5.1



Gambar 5.1 Dendrogram uji similaritas hubungan kekerabatan 14 isolat bakteri asam laktat asal kolon Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*).

Berdasarkan Gambar 5.1 isolat BAL yang terkoleksi dapat dikelompokkan menjadi 3 kelompok isolat BAL yang mempunyai genus dan spesies yang berbeda. Kelompok satu terdiri dari isolat AZ, AW, AV, BR, BQ dan BP yang memiliki karakteristik mendekati spesies *Lactobacillus plantarum*. Isolat AZ yang merupakan spesies dengan nilai similaritas sebesar 1,00. Isolat BQ dan BR yang merupakan satu spesies dengan nilai similaritas sebesar 0,97. Isolat BP yang merupakan spesies dengan nilai similaritas sebesar 0,95. Isolat AV dan AW yang merupakan satu spesies dengan nilai similaritas sebesar 0,95. Kelompok kedua terdiri dari isolat BO, BM, CM, CJ dan CL yang memiliki karakteristik mendekati spesies *Lactobacillus acidophilus*. Isolat CM dan BN yang merupakan satu spesies dengan nilai similaritas sebesar 0,97. Isolat BO yang merupakan spesies dengan nilai similaritas sebesar 0,97. Isolat CJ dan CL yang merupakan satu spesies dengan nilai similaritas sebesar 0,94. Kelompok ketiga terdiri dari isolat AT, AS dan CK yang memiliki karakteristik mendekati spesies *Lactococcus lactis*. Isolat AT dan AS yang merupakan satu spesies dengan nilai similaritas sebesar 0,97. Isolat CK yang merupakan spesies dengan nilai similaritas sebesar 1,00. Hasil karakterisasi isolat BAL asal kolon kelinci didominasi *Lactobacillus* sp. Menurut pendapat (Dibner & Richard, 2005) bahwa koloni BAL genus *Lactobacillus* banyak ditemukan pada saluran pencernaan hewan.

Menurut Benson (2002), nilai similaritas bekisar antara 0 sampai 1 dan hubungan kekerabatan dekat apabila nilai similaritas makin dekat dengan 1. Nilai indeks similaritas atau inkes kesamaan digunakan untuk membandingkan kesamaan yang ditemukan antara satu komunitas dengan komunitas lainnya. Berdasarkan konsep taksospecies, suatu individu termasuk ke dalam jenis spesies berbeda jika

memiliki indeks similaritas kurang dari 70%. Menurut Tortora dkk (2002), jika terdapat dua strain mikroba yang memiliki indeks similaritas $\geq 70\%$ maka kedua strain mikroba tersebut dapat dikatakan sebagai satu spesies, dapat dikatakan satu genus jika indeks similaritas antara $\leq 70\%$ dan dapat dikatakan satu strain apabila indeks similaritas 100%.

5.2. Pengaruh Ketahanan Asam Lambung

Salah satu syarat menjadi kandidat probiotik yaitu bakteri asam laktat harus mampu tahan terhadap pH rendah. Hal ini dikarenakan sebelum mencapai saluran pencernaan bakteri harus mampu bertahan saat melewati pH asam lambung yang pHnya rendah yaitu pH 2. Pada uji ini dilakukan pada media MRSA yang merupakan media yang tepat untuk menumbuhkan bakteri asam laktat. Kemampuan isolat bakteri untuk bertahan dalam suasana asam di lambung dievaluasi dengan menginkubasi bakteri dalam suasana pH 2, kemudian jumlah mikroba sebelum dan setelah inkubasi pada MRSA dibandingkan pada 0 jam. Uji ketahanan bakteri asam laktat asal kolon kelinci dilakukan selama 3 jam dikarenakan sesuai dengan waktu transit makanan ke lambung. Nilai ketahanan asam terhadap pH 2 ditampilkan pada tabel 5.4.

Tabel 5.4 Data uji ketahanan asam bakteri asam laktat asal kolon kelinci

Kode Isolat	Jumlah Pada 0 Jam (log CFU/ml)	Jumlah Koloni Bakteri Asam Laktat (log CFU/ml) Setelah di Inkubasi Selama 3 Jam Pada pH 2	
		pH2	%*
AZ	8,83	4,33	49,03
AW	8,67	5,27	60,78
AV	6,50	5,98	92,00
AT	8,25	5,18	62,78
AS	8,75	4,90	56,00
BR	8,37	4,89	58,42
BQ	8,80	4,77	54,20
BP	8,81	3,86	43,81
BO	8,88	7,50	84,45
BN	8,63	4,89	56,66
CM	8,05	4,91	60,99
CK	8,40	5,52	65,71
CJ	8,18	4,60	56,23
CL	8,79	5,20	59,15

Keterangan:

*Persentase jumlah koloni bakteri asam laktat yang tumbuh pada perlakuan pH 2.

Isolat AV adalah isolat yang mengalami penurunan jumlah koloni yang paling sedikit dibandingkan dengan isolat BAL yang lain. Menurut Gottschalk (2008) bakteri penghasil asam seperti BAL dapat hidup dalam lingkungan asam karena dapat melindungi dirinya dengan memproduksi senyawa yang dapat menetralkan asam. Kemampuan hidup pada lingkungan asam dapat juga disebabkan karena bakteri mampu menahan masuknya proton (H^+) ke dalam sel yang terjadi secara pasif (lingdren, 2003). Selanjutnya menurut Alakomi (2000), ketahanan hidup yang lebih baik pada pH asam juga disebabkan terjadinya proses adaptasi terhadap permeabilitas dinding sel bakteri pada lingkungan asam.

Penyebab penurunan jumlah koloni bakteri setelah diinkubasi pada pH 2 disebabkan oleh terjadinya kematian sel bakteri. Kematian tersebut menyebabkan sel tidak dapat tumbuh menjadi koloni ketika ditumbuhkan di media agar.

Mekanisme kematian sel akibat kondisi asam disebabkan oleh akumulasi H^+ sehingga terjadi keasaman pada sitoplasma. Keasaman disitoplasma selanjutnya dapat menyebabkan terganggunya transport substrat ke dalam sel dan sintesis molekul makro (Lingdren, 2003). Pada hasil 14 isolat tidak ditemukan kematian pada seluruh sel setelah di inkubasi pada pH 2, peristiwa kematian seluruh sel dapat terjadi apabila isolat tersebut bukan mikroorganisme asli saluran pencernaan, tetapi berasal dari lingkungan (*mikroorganisme transient*).

5.3 Pengaruh Garam Empedu Terhadap Ketahanan Hidup BAL

Nilai ketahanan terhadap garam empedu pada isolat BAL ditampilkan pada Tabel 5.5. Hasil pengamatan menunjukkan ketahanan hidup BAL terhadap garam empedu (oxgall 0,3%) sangat bervariasi. Isolat AZ ketahanan hidup paling rendah yaitu 46,97 % sedangkan yang paling tinggi adalah isolat AV yaitu 94,17 %.

Tabel 5.5 Data uji pengaruh garam empedu pada ketahanan hidup BAL

Kode Isolat	Peningkatan OD Isolat BAL (OD/jam)		Nilai Ketahanan Hidup Terhadap Garam Empedu (%)
	Oxgall 0,3%	Tanpa Oxgall 0,3%	
AZ	0,070	0,149	46,97
AW	0,092	0,108	85,18
AV	0,097	0,103	94,17
AT	0,093	0,182	51,09
AS	0,092	0,116	79,31
BR	0,125	0,155	80,64
BQ	0,130	0,152	85,52
BP	0,085	0,103	82,52
BO	0,083	0,097	85,56
BN	0,078	0,092	84,78
CM	0,064	0,088	72,72
CK	0,090	0,104	86,53
CJ	0,072	0,092	78,26
CL	0,085	0,100	85,00

Ketahanan hidup terhadap garam empedu pada bakteri gram positif seperti

BAL disebabkan karena bakteri ini menghasilkan enzim *bile salt hydrogenase*

(BSH). Enzim BSH ini dibutuhkan untuk mendetoksifikasi asam glikodeoksikolat (GDCAH) yang masuk ke dalam sel bakteri menjadi bentuk yang lebih mudah dikeluarkan dari sel yaitu asam deoksikolat (DCAH) (Smet et al, 2000). GDCAH merupakan penyusun garam garam empedu yang masuk ke dalam sel bakteri melalui difusi pasif. GDCAH di dalam bakteri akan terdisosiasi menjadi ion glikodeoksikolat (GDCA^+) dan ion H^+ . Disosiasi asam tersebut menyebabkan terjadinya penurunan pH di dalam sel bakteri. Penurunan pH didalam sel dapat dicegah, bila sel bakteri dapat menghasilkan enzim BSH yang mampu mendekongugasi GDCA^+ menjadi DCA^+ . Ion DCA^+ akan membentuk asam deoksikolat (DCAH) dengan menangkap proton H^+ . DCAH ini lebih mudah dikeluarkan dari sel karena hanya memerlukan sedikit ATP. Melalui mekanisme tersebut keseimbangan pH di dalam sel bakteri dapat dipertahankan. Bakteri yang tidak menghasilkan enzim BSH akan terjadi penurunan pH akibat akumulasi H^+ . penurunan pH dapat mengganggu transport nutrisi kedalam sel bakteri sehingga dapat menyebabkan pertumbuhan sel terhambat (Hunter, 2003). Selain sekresi garam empedu terdapat hambatan lain bagi pertumbuhan mikroorganisme secara normal yaitu fluktuasi pH yang tinggi dan laju aliran pakan yang cepat (Freter, 2006).

5.4 Pemilihan Isolat BAL Terbaik Sebagai Probiotik

Pemilihan isolat terbaik dilakukan melalui metode ranking yang ditentukan berdasarkan kemampuan masing-masing isolat terhadap ketahanan isolat terhadap pH 2 dan ketahanan terhadap garam empedu. Kedua sifat tersebut merupakan sifat utama yang harus dimiliki oleh isolat yang dinyatakan probiotik. Dalam metode ini isolat yang menempati peringkat pertama dinyatakan sebagai isolat yang

berkemampuan terbaik, begitu pula seterusnya, semakin besar peringkat ranking, semakin buruk kemampuannya. Data ranking bisa dilihat pada tabel 5.6

Tabel 5.6 Ranking isolat BAL asal kolon kelinci berdasarkan kemampuan ketahanan terhadap asam dan ketahanan terhadap garam empedu

Isolat	(%)Ketahanan terhadap			
	pH 2	Ranking	Oxgall	Ranking
AZ	49,03	13	46,97	14
AW	60,99	6	85,18	5
AV*	92,00	1	94,17	1
AT	58,42	4	51,09	13
AS	54,20	11	79,31	10
BR	43,81	8	80,64	9
BQ	60,78	12	85,52	4
BP	56,66	14	82,52	8
BO	84,45	2	85,56	3
BN	56,23	9	84,78	7
CM	59,15	5	72,72	12
CK	62,78	3	86,53	2
CJ	56,00	10	78,26	11
CL	65,71	7	85	6

Keterangan: *Isolat yang direkomendasikan sebagai bahan probiotik

Isolat AV relatif tahan terhadap pH 2 dengan nilai 92,00 % dan ketahanan hidup terhadap garam empedu (0,3% Oxgall) adalah 94,17 %. Berdasarkan semua uji karakterisasi serta uji potensi maka dengan pertimbangan diatas maka isolat AV layak digunakan sebagai bahan probiotik



BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan :

1. Terdapat isolat bakteri asam laktat hasil isolasi dari kolon kelinci (*Oryctolagus Cuniculus*) dengan rerata jumlah bakteri sampel kerokan sebesar $2,96 \pm 0,51 \times 10^5 \text{CFU/mL}$ dan rerata jumlah bakteri sampel bilasan sebesar $1,60 \pm 0,14 \times 10^5 \text{CFU/mL}$
2. Pada kolon didapatkan BAL yang teridentifikasi sebagai *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus achidopilus* dan *Lactococcus lactis* dan isolat terbaik yaitu isolat dengan kode AV yang merupakan bakteri asam laktat *Lactobasilus plantarum* asal kolon kelinci yang berpotensi sebagai kandidat probiotik.

6.2 Saran

Adapun saran yang dapat disampaikan:

1. Perlu dilakukan proses inkubasi secara anaerob saat proses isolasi bakteri untuk mendapatkan jumlah isolat yang lebih optimal
2. Perlu dilakukan karakterisasi lebih lanjut menggunakan KIT atau instrument PCR untuk mengetahui spesies BAL.

DAFTAR PUSTAKA

- Abun. 2008. Hubungan Mikroflora Dengan Metabolism Dalam Saluran Pencernaan Unggas dan Monogastrik. Universitas Padjajaran. Jatinangor
- Amin, 2001. Efektivitas Bakteri Asam Laktat dalam Menghambat Bakteri. Airlangga. Jogjakarta.
- Anggraeny, 2001. Pengaruh Pemberian Bakteri Asam Laktat terhadap Pencernaan Secara Invitro. Thesis Pascasarjana Universitas Padjajaran, Bandung
- Astuti, M., 2009. Pemuliaan Ternak, Pengembangan dan Usaha Perbaikan Genetik Ternak Lokal. Pidato Pengukuhan Guru Besar dalam Ilmu Pemuliaan Ternak pada Fakultas Peternakan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
- Chou, L. S, and B. Weimer. 2000. Isolation and characterization of acid and bile tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. J. Dairy Sci., 62 : 23-31.
- Dwidjoseputro, D. 2005. Dasar–Dasar Mikrobiologi. Jakarta: Djambatan
- Ernawati. 2010. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat pada Susu Kambing Segar. SKRIPSI. Malang: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim
- FAO/WHO. 2002. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London.
- Fardiaz, S. 2002. Mikrobiologi Pangan. Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi. Fateta IPB. Bogor.
- Fuller, R. 2009. A review: Probiotics in man and animals. J. Appl. Bact. 66, 365-378.
- Gaggia, F., P. Mattarelli and B. Biavati. 2010. Probiotic and prebiotics in animal feeding for safe food production. Intl. J. Food Microbiol. 14: 515 – 528.
- Gibson G.R dan Roberfroid M.B. 2000. Dietary Modulation of the human colonic mikrobiota: Introducing the concept of Prebiotics, Jurnal Nutrisi 125:1401 – 1412
- Gilliland, S.E. (2001). *Acidophilus* milk products: A review of potential benefits to consumers. Journal of Dairy Science 72: 2483-2494.
- Gunawan dan M.M.S. Sundari. 2003. Pengaruh Penggunaan Probiotik dalam Ransum terhadap Produktivitas Ayam. Jurnal, WARTAZOA Vol. 13 No. 3 Th. 2003 hal 92-98. Institut Pertanian Bogor, Fakultas Peternakan. Bogor.

- Guyton, A.C., dan Hall, J.E. 2008. Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. Edisi 11. Jakarta: EGC
- Hill, M. J. 1995. Role of Gut Bacteria in Human Toxicology and Pharmacology. Taylor, New York.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. and Williams, S. T, 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. Baltimore, Williams and Wilkins. m787.
- Hosseini, S.V., Arlindo, S., Bohme, K., Fernandez-No, C., Calo-Mata, P. dan Barros-Velazques, J. 2009. Molecular and probiotic characterization of bacteriocin producing *Enterococcus faecium* strains isolated from nonfermented animal foods. *Journal of Applied Microbiology*: 107: 1392-1403.
- Hustamin, R., 2006. Panduan Memelihara Kelinci Hias. Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Jacobsen, C. N., V. R. Nielsen, A. E. Hayford, P. L. Moller, K. F. Michaelsen, A. P. Erregard, B. Sandstrom, M. Tvede, and M. Jakobsen. 2000. Screening of probiotic activities of forty seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in human. *J. App. Environ. Microbiol.*, 65: 4949-4956.
- Johnson-Delaney, C.A., 2006, *Exotic Companion Medicine Handbook for Veterinarians*, Zoological Education Network, Florida, USA, p.98.
- Kartadisastra, H. R., 1994. Kelinci Unggul. Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
- Korhonen, J., 2010, *Forestry and Natural Sciences : Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria*, University of Eastern Finland.
- Kusumawati, N; Bettysri, L J; Siswa S; Ratihdewanti dan Hariadi. 2003. Seleksi Bakteri Asam Laktat Indigenous sebagai Galur Probiotik dengan Kemampuan Menurunkan Kolesterol. 10 *Journal Mikrobiologi Indonesia*. Vol. 8(2): 39-43.
- Khunajakr, 2008. Khunajakr, N., Wongwicharn, A., Moonmangmee, D. and Tantipaiboonvut, S. Screening and identification of lactic acid bacteria producing antimicrobial compounds from gastrointestinal tracts. *KMITL Sci. Tech. J.* 2008; 8:8-17.
- Mourad, K, and K. N. Eddine. 2006. In vitro preselection criteria for probiotic *Lactobacillus plantarum* strains of fermented Olives origin. *J. Probio. Prebio.*, 1(1): 27-32.

- Nurisva, Yuni, Mayasari, Jamsari. 2013. Isolasi, Karakterisasi dan Identifikasi DNA Bakteri Asam Laktat (BAL) yang Berpotensi Sebagai Anti Mikroba Dari Fermentasi Markisa Kuning. Padang: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Andalas
- Raharjo, Sugeng. 2012. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat (BAL) dari Usus Halus Itik Mojosari (*Anas platyrhynchos*). Jurnal biologi. Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Sarwono, B., 2008. Kelinci Potong dan Hias. Agromedia Pustaka, Jakarta.
- Sissons, J.W. (1989). Potensial of Probiotic Organisms to Prevent Diarrhoea and Promote Digestion in Farm Animals-a review. Journal of the Science of Food and Agriculture, 49, 1-13.
- Subroto, Seno. 2003. Beternak Kelinci. Penerbit Aneka Ilmu, Semarang.
- Sudaryanto, B. 2007. *Budidaya Ternak Kelinci di Perkotaan*. Balai pengkajian teknologi pertanian : Yogyakarta.
- Suwarsono, R.H. (2001), Struktur dan Metabolisme Sel, Universitas Brawijaya, Malang.
- Sanusi, A., 2006. Pengaruh Penambahan Starbio dalam Ransum terhadap Kecernaan Bahan Kering dan Bahan Organik pada Kelinci Lokal Jantan. Skripsi. Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Salminen, S., Wright, AV., Ouwehand A. 2004. Lactic Acid Bacteria. New York: Marcel Dekker.
- Suharsono, 2003. Perkembangan Probiotik untuk Ternak Basis Aplikasi dan Aspek Praktis. Widyapress. Padjajaran.
- Susilorini, 2008. Beternak Kelinci Unggul. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Sutrisna, R. 2013. Karakterisasi Isolat Bakteri Asam Laktat Dari Usus Itik (*Anas domestica*) Terhadap *Escherichia coli* dan *Salmonella pullorum*. Jurusan Peternakan Fakultas. Fakultas Pertanian Universitas Lampung: Bandar Lampung.
- Tillman, A. D., H. Hartadi., S. Reksohadiprodjo., S. Prawitokusumo., S. Lebdoesoekojo., 1991. Ilmu Makanan Ternak Dasar. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Yanis, M., 2006. Karakteristik Produk Olahan Berbasis Daging Kelinci. BALAI Pengkajian teknologi Pertanian Jakarta. Jakarta Selatan.

Zavaglia, A. G., G. Kociubinski., P. Perez, and G. De Antoni. 2008. Isolation and characterization of Bifidobacterium strains for probiotic formulation. J. Food.Protect.,61(7):865-873.



